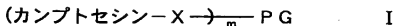


【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の式：

【化1】



を有するポリグルタミン酸-カンプトセシン結合体を含む組成物であって、ここで：

PGは、ポリグルタミン酸ポリマーであり；

Xは、単結合、アミノアシルリンカー- $[\text{OC}-(\text{CHR}')_n-\text{NH}]_m-$ 、またはヒドロキシアシルリンカー- $[\text{OC}-(\text{CHR}')_n-\text{O}]_m-$ であり、ここでR'は、天然に存在するアミノ酸の側鎖であり；

カンプトセシンは、20(S)-カンプトセシンまたは生物学的に活性な20(S)カンプトセシンアナログであり；

mは、5～65の正の整数であり；

カンプトセシン-Xは、エステルまたはアミド結合を通して該ポリマーのカルボキシル基に共有結合し；

nは、1と10との間の整数であり；そして

pは、1と10との間の整数である、

組成物。

【請求項2】 Xが単結合である、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】 請求項1に記載の組成物であって、ここで：

Xは、アミノアシルリンカー- $[\text{OC}-(\text{CHR}')_n-\text{NH}]_m-$ またはヒドロキシアシルリンカー- $[\text{OC}-(\text{CHR}')_n-\text{O}]_m-$ であり；ここでR'は、天然に存在するアミノ酸の側鎖であり；

nは、1と10との間の整数であり；そして

pは、1と10との間の整数である、

組成物。

【請求項4】 前記ポリグルタミン酸ポリマーが、約5000～約100,000の分子量を有する、請求項1に記載の組成物。

【請求項5】 前記ポリグルタミン酸ポリマーが、約20,000～約80,000の分子量を有する、請求項4に記載の組成物。

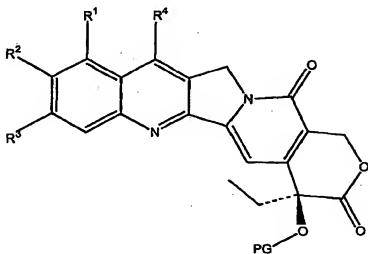
【請求項6】 前記ポリグルタミン酸ポリマーが、約25,000～約60,000の分子量を有する、請求項5に記載の組成物。

【請求項7】 請求項1に記載の組成物であって、ここで、前記カンプトセシンアナログが、20(S)-カンプトセシン；20(S)-トポテカン；20(S)-9-アミノカンプトセシン；20(S)-9-ニトロカンプトセシン；20(S)-10-ヒドロキシカンプトセシン；SN-38；20(S)-10,11-メチレンジオキシカンプトセシン；ルロトテカン；イリノテカン；DX-8951FまたはDB67からなる群から選択される、組成物。

【請求項8】 請求項7に記載の組成物であって、ここで、前記カンプトセシンアナログが、20(S)-カンプトセシン、20(S)-9-アミノカンプトセシン、20(S)-9-ニトロカンプトセシン、20(S)-7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン、20(S)-10-ヒドロキシカンプトセシンおよび20(S)-10-アセトキシカンプトセシンから選択される、組成物。

【請求項9】 請求項2に記載の組成物であって、ここで、前記ポリグルタミン酸-カンプトセシン結合体が、以下の式：

【化2】



を有し、そして前記カンプトセシンが、以下：

(a) 20(S)-カンプトセシン、ここで R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 は、各々Hであり；

(b) 20(S)-9-アミノカンプトセシン、ここで R^1 は $-NH_2$ であり、そして R^2 、 R^3 および R^4 は、各々Hであり；

(c) 20(S)-9-ニトロカンプトセシン、ここで R^1 は $-NO_2$ でありそして R^2 、 R^3 および R^4 は、各々Hであり；

(d) 20(S)-10-ヒドロキシカンプトセシン、ここで R^1 、 R^3 および R^4 は、各々Hであり、そして R^2 は $-OH$ であり；または

(e) 20(S)-10-アセトキシカンプトセシン、 R^1 、 R^3 および R^4 は、各々Hであり、そして R^2 は、 $-O-C(O)-CH_3$ である、

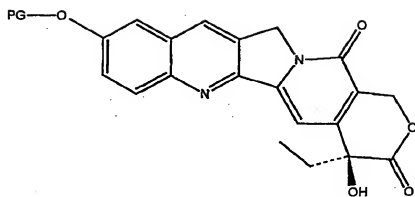
から選択される、組成物。

【請求項10】 請求項9に記載の組成物であって、前記ポリグルタミン酸ポリマーが、約25,000～約60,000の分子量を有する、組成物。

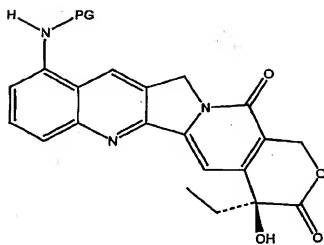
【請求項11】 前記カンプトセシンが20(S)-カンプトセシンであり、そして該20(S)-カンプトセシンが、前記結合体の約10重量%～約16重量%を構成する、請求項10に記載の組成物。

【請求項12】 請求項3に記載の組成物であって、前記ポリグルタミン酸-カンプトセシン結合体が、以下の式IⅢ、式IⅣ、または式V：

【化3】

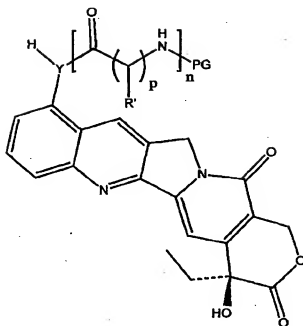


III



IV

〔化 4 〕

 V_i

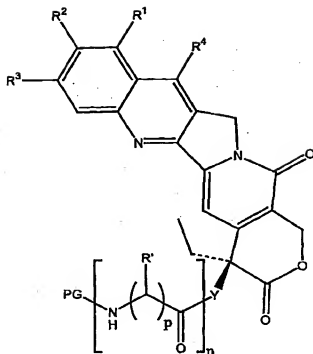
から選択され、ここで、YはNまたはOである、組成物。

【請求項 13】 前記ポリグルタミン酸ポリマーが、約 30,000 ～ 約 60,000 の分子量を有する、請求項 12 に記載の組成物。

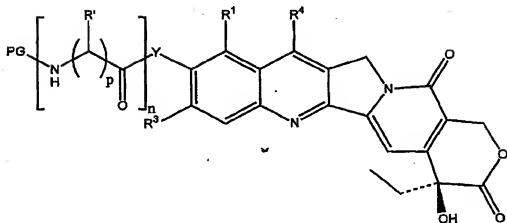
【請求項 14】 前記カンプトセシンが、前記結合体の約 10 重量%～約 16 重量%を構成する、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 15】 請求項 3 に記載の組成物であって、ここで、前記ポリグルタミン酸-カンプトセシン結合体構造が、以下の式 VI または VII :

【化 5】



VI



VII

から選択され、ここで：

Y は、N または O であり；

R' は、天然に存在するアミノ酸の側鎖であり；

R¹ は、-NH₂ または H であり；

R² は、-H、-OH、または -O-C(O)-CH₃ であり；

R³ は、-H またはアルキルであり；そして

R⁴ は、-H、アルキル、またはトリアルキルシリルである、

組成物。

【請求項16】 R' がHである、請求項15に記載の組成物。

【請求項17】 前記ポリグルタミン酸ポリマーが、約30,000～約60,000の分子量を有する、請求項16に記載の組成物。

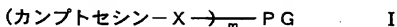
【請求項18】 前記20(S)-カンプトセシンが、前記結合体の約10重量%～約50重量%を構成する請求項17に記載の組成物。

【請求項19】 前記20(S)-カンプトセシンが、前記結合体の約15重量%～約38重量%を構成する、請求項18に記載の組成物。

【請求項20】 $PG-gly-CPT$ 、 $PG-gly-(10-OH-CPT)$ または $PG-gly-(9-NH-CPT)$ を含む組成物であって、ここで、該PGが、約25,000～約60,000の分子量を有し、そして20(S)-カンプトセシンが、結合体の約10重量%～約50重量%を構成する、組成物。

【請求項21】 以下の式：

【化6】



を有するポリグルタミン酸-カンプトセシン結合体を含む組成物を調製する方法であって、ここで：

PGは、ポリグルタミン酸ポリマーであり；

Xは、単結合、アミノアシルリンカー $[OC-(CHR')_n-NH]$ 、またはヒドロキシアシルリンカー $[OC-(CHR')_n-O]$ 、であり、ここで、R' は、天然に存在するアミノ酸の側鎖であり；

カンプトセシンは、20(S)-カンプトセシンまたは生物学的に活性な20(S)-カンプトセシンアナログであり；

mは、5～65の正の整数であり；

カンプトセシン-Xは、エステルまたはアミド結合を通して該ポリマーのカルボキシル基に共有結合し；

nは、1と10との間の整数であり；そして

p は、1 と 10 との間の整数であり、

ここで該方法は、以下：

(a) 粘度によって決定される場合に約 25,000 ～ 約 60,000 ダルトンの MW を有するポリグルタミン酸ポリマー、およびこれに結合体化するための 20(S)-カンプトセシンを提供する工程；ならびに

(b) ポリマー 1 モルあたり少なくとも 5 モルの 20(S)-カンプトセシンが結合するのに十分な条件下で、該 20(S)-カンプトセシンを、該ポリグルタミン酸ポリマーに共有結合させ、これによって該ポリグルタミン酸-カンプトセシン結合体を形成する工程、

を包含する、方法。

【請求項 22】 前記 20(S)-カンプトセシンが、20(S)-9-アミノカンプトセシン、20(S)-10-ヒドロキシカンプトセシンまたは 20(S)-カンプトセシンから選択される、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】 前記 20(S)-カンプトセシンが、前記結合体の約 10 重量％～約 16 重量％を構成する、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】 ポリグルタミン酸-カンプトセシン結合体を含む組成物を調製する方法であって、該方法は、以下：

(a) プロトン化形態のポリグルタミン酸ポリマー、およびこれに結合体化するための 20(S)-カンプトセシンまたは生物学的に活性な 20(S)-カンプトセシンアナログを提供する工程；

(b) 該ポリグルタミン酸ポリマーおよび該 20(S)-カンプトセシンを、ビス(2-オキソ-3-オキサゾリジニル)ホスフィン酸の存在下、不活性有機溶媒中で、ポリグルタミン酸-カンプトセシン結合体を形成するのに十分な条件下で反応させる工程；ならびに

(c) 該ポリグルタミン酸-カンプトセシン結合体を、過剰量の塩水溶液の添加によって溶液から沈殿させる工程、

を包含する、方法。

【請求項 25】 さらに、以下：

(d) 前記沈殿物を洗浄して、未反応の 20(S)-カンプトセシンを除去する

工程、

を包含する、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】 クロロメチルピリジニウムヨージドが、工程 (b) におけるビス (2-オキソ-3-オキサゾリジニル) ホスフィン酸と置き換えられる、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 27】 前記ポリグルタミン酸ポリマーが、粘度によって測定される場合に約 25,000 ~ 約 60,000 ダルトンの MW を有する、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 28】 前記 20 (S)-カンプトセシンが、前記結合体の約 10 重量% ~ 約 16 重量% を構成する、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】 抗腫瘍のおよび/または抗白血病に有効量の、請求項 1、11 または 14 のいずれか 1 項に記載のポリグルタミン酸-カンプトセシン結合体、あるいはその薬学的に受容可能な塩、ならびに薬学的に受容可能なキャリアおよび/または希釈剤を含む、薬学的組成物。

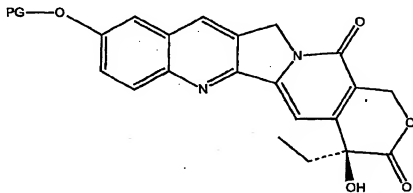
【請求項 30】 抗腫瘍のおよび/または抗白血病に有効量の、請求項 20 に記載のポリグルタミン酸-カンプトセシン結合体またはその薬学的に受容可能な塩、ならびに薬学的に受容可能なキャリアおよび/または希釈剤を含む、薬学的組成物。

【請求項 31】 白血病または固形腫瘍を処置する方法であって、該方法は、このような処置が必要な患者に、請求項 30 に記載の薬学的組成物を投与する工程を包含し、これによって該白血病または該固形腫瘍の処置をもたらす、方法。

【請求項 32】 請求項 21 ~ 28 の 1 項に記載の方法に従って調製される、ポリグルタミン酸-カンプトセシン結合体を含む組成物。

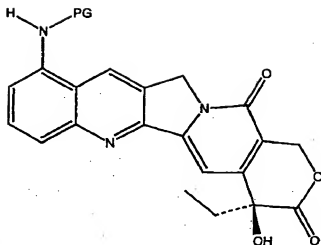
【請求項 33】 以下の式 I I I、式 I V、または式 V：

〔化 7〕

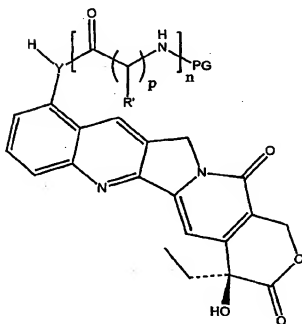


III

【化8】



IV



V;

を有するポリグルタミン酸-カンプトセシン結合体を含む組成物であって、ここ
で：

PGは、ポリグルタミン酸ポリマーであり；

Yは、NまたはOであり；

R'は、天然に存在するアミノ酸の側鎖であり；

nは、1と10との間の整数であり；そして

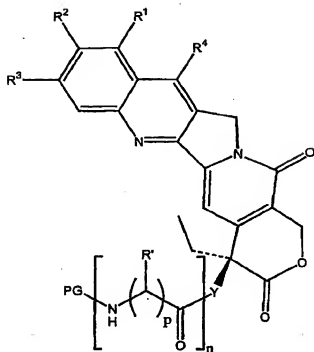
pは、1と10との間の整数であり；

そしてここで、該ポリグルタミン酸ポリマーは、約 30,000 ～ 約 60,000 の分子量を有する、

組成物。

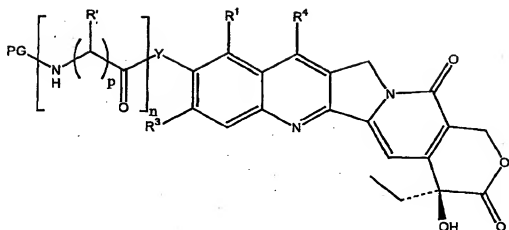
【請求項 34】 以下の式 VI または式 VII :

【化 9】



VI

【化 10】



VII

を有するポリグルタミン酸-カンプトセシン結合体を含む組成物であって、ここで：

Y は、N または O であり；

R' は、天然に存在するアミノ酸の側鎖であり；

R¹ は、-NH₂ または H であり；

R² は、-H、-OH、または -O-C(=O)-CH₃ であり；

R³ は、-H またはアルキルであり；そして

R⁴ は、-H、アルキルまたはトリアルキルシリルであり；そして

ここで、該ポリグルタミン酸ポリマーは、約 30,000 ~ 約 60,000 の分子量を有する、

組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、カンプトセシンおよび生物学的に活性なカンプトセシンアナログのそれぞれに共有結合したポリグルタミン酸ポリマーを含む組成物に関する。本発明はまた、このような化合物の調製および薬学的用途に関する。

【0002】

(発明の背景)

カンプトセシンは、*Campthotheca acuminata* 木から得られる水不溶性の、光学的に活性なアルカロイドである。20(S)-カンプトセシンおよび20(S)-カンプトセシンアナログは細胞毒性因子であり、DNAのホスホジエステル骨格のトポイソメラーゼI誘導性の一本鎖分解を安定化させて再連結を防ぐことにより作用すると考えられている。これは、複製の間の二本鎖DNA分解の生成を導き、これが修復されない場合はアポトーシスを引き起こす。

【0003】

20(S)-カンプトセシンおよび多くの20(S)-カンプトセシンアナログは、水不溶性である。これらの薬物の多くは、ヒト癌細胞株およびインビボの動物異種移植片に対する優れた抗腫瘍活性を示す。しかし、それらの水不溶性は、これらの薬物を投与することを困難にしている。さらに、薬理学的に重要な20(S)-カンプトセシンおよびそのアナログのラクトン環は、ヒト血漿アルブミンの存在下で不安定であり、このアルブミンに結合する不活性なカルボキシレート形態への活性な薬物の変換を引き起こす。20(S)-カンプトセシンおよび20(S)-カンプトセシンアナログのこの薬学的および薬物動態学的な欠点を克服するための1つのアプローチは、それらをポリエチレングリコールのような中性ポリマーに共有結合することである(例えば、以下の参考文献1および参考文献2を参照のこと)。このアプローチを用いて、ほとんどの活性なカンプトセシンの水不溶性は改善され得、その結果、結合体化したポリマーは、水性の媒体中で非経口的に投与され得る。

【 0 0 0 4 】

所定の用量の活性薬物を投与するために必要とされるポリマーの総量を減少させるために、ポリマー鎖あたりより多量の20(S)-カンプトセシンまたは20(S)-カンプトセシンアナログを安定化することが可能な新規のポリマー結合体に対する必要性が継続して存在する。同様に、20(S)-カンプトセシンの結合体化されていない水溶性プロドラッグおよびアナログにおいては見出されない、抗腫瘍因子としての固有の特性を有し得る新規のポリマー結合体に対する必要性が継続して存在する。

【 0 0 0 5 】

(背景刊行物)

1. 米国特許第5,646,159号
2. Greenwald et al., Bioorg. Med. Chem. 6:551-562 (1998)
3. 米国特許第5,545,880号
4. Conover et al., Cancer Chemother. Pharmacol. 42:407-414 (1998)
5. PCT公開 WO99/17804
6. Hesswijk et al., J. Cont. Re. 1:312 (1985)
7. 米国特許第5,880,131号
8. 米国特許第5,892,043号
9. 米国特許第5,837,673号
10. 米国特許第5,854,006号
11. 米国特許第5,340,817号
12. 米国特許第4,943,579号
13. Singer et al., Ann. NY Acad. Sci. 922:136-150 (2000)

(発明の詳細な説明)

(定義)

本明細書で用いる場合、「ポリグルタミン酸」または「ポリグルタミン酸ポリマー」は、ポリ(L-グルタミン酸)、ポリ(D-グルタミン酸)、ポリ(DL-グルタミン酸)、ポリ(L-γグルタミン酸)、ポリ(D-γグルタミン酸)、およびポリ(DL-γグルタミン酸)を含む。好ましくは、ポリグルタミン酸ポリマーは、そのアミノ酸残基の少なくとも50%をグルタミン酸として含み、より好ましくは100%である。治療剤に結合体化される場合に、置換されたポリグルタミン酸ポリマーは、結合体化されていない治療剤と比べて水溶性および/または有効性が改善されるという条件で、ポリグルタミン酸ポリマーは、天然に存在するかまたは化学的に改変されたアミノ酸(好ましくは、親水性アミノ酸)で50%まで置換され得、そして好ましくは、非免疫原性である。

【0006】

本明細書に記載される本発明による結合体の調製において用いられるポリグルタミン酸ポリマーの分子量は、代表的に5000ダルトンよりも大きく、好ましくは20kD~80kDであり、より好ましくは25kD~60kDである(粘度により決定された分子量)。当業者は、この分子量値が他の方法により測定される場合に異なり得ることを理解する。これらの他の方法として、例えば、ゲル浸透、小角光散乱、多重角レーザー光散乱(multiple angle laser light scattering)、屈折率およびそれらの組合せが挙げられる。

【0007】

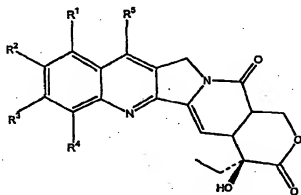
本明細書で用いる場合、「PG」は、ポリグルタミン酸ポリマーをいう。

【0008】

本明細書で用いる場合、「カンプトセシン」は、20(S)-カンプトセシンまたは生物学的に活性な20(S)-カンプトセシンアナログをいう。「CPT」は、以下に示す構造を有する20(S)-カンプトセシンをいう。

【0009】

【化11】



ここで、 $R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = R^5 = H$ である。

【 0 0 1 0 】

「20(S)-カンプトセシンアナログ」は、生物学的に活性な20(S)-カンプトセシンアナログをいい、ここで、上記のカンプトセシン構造の1つ以上のR基が、H以外である。例えば、Wang et al., Med. Res. Rev. 17:367-425 (1997); Labergne and Bigg Bull. Cancer (Paris) 1:51-8 (1998); および本明細書の表2を参照のこと。

【 0 0 1 1 】

本明細書で用いる場合、用語「ポリグルタミン酸-カンプトセシン結合体」または「PG-カンプトセシン」は、ポリグルタミン酸のカルボン酸基と治療剤の官能基との間の直接的な連結により、または二機能性スペーサー基を介した間接的な連結により、20(S)-カンプトセシンまたは生物学的に活性な20(S)-カンプトセシンアナログに共有結合されたポリグルタミン酸ポリマーをいう。好ましいスペーサー基は、循環中の加水分解に対して比較的安定であり、生分解性であり、そして結合体から切断される場合に非毒性であるスペーサーである。適切なスペーサーは、この結合体の抗腫瘍効力を妨害しないことが理解される。例示的なスペーサーとして、アミノ酸（例えば、グリシン、アラニン、β-アラニン、グルタミン酸、ロイシン、イソロイシン）、 $-[NH-(CHR')]$ 、 $-CO]$ 、 $-$ （ここで、 R' は、天然に存在するアミノ酸の側鎖であり、 n は、1と10との間、最も好ましくは1と3との間の整数であり、そして p は、1と

10との間、最も好ましくは1と3との間の整数である)、一般式 $-\text{[O}-(\text{CHR}')-\text{CO}]_n-$ のヒドロキシ酸(ここで、 R' は、天然に存在するアミノ酸の側鎖であり、 n は、1と10との間、最も好ましくは1と3との間の整数であり、そして p は、1と10との間、最も好ましくは1と3との間の整数である(例えば、2-ヒドロキシ酢酸、4-ヒドロキシ酪酸)); ジオール、アミノチオール、ヒドロキシチオール、アミノアルコール、およびこれらの組合せが挙げられる。現在好ましいスパーサーはアミノ酸であり、より好ましくは天然に存在するアミノ酸であり、より好ましくはグリシンである。治療剤は、生理学的に切断可能な結合(すなわち、生きている動物有機体における状態に適する酵素的または非酵素的機構により切断可能な結合)を生じる任意の連結方法により、ポリマーまたはスパーサーに連結され得る。好ましい連結の例として、エステル、アミド、カルバメート、カルボネート、アシルオキシアルキルエーテル、アシルオキシアルキルチオエーテル、アシルオキシアルキルエステル、アシルオキシアルキルアミド、アシルオキシアルコキシカルボニル、アシルオキシアルキルアミン、アシルオキシアルキルアミド、アシルオキシアルキルカルバメート、アシルオキシアルキルスルホンアミド、ケタール、アセタール、ジスルフィド、チオエステル、 N -アシルアミド、アルコキシカルボニルオキシアルキル、尿素、および N -スルホニルイミデートが挙げられる。現在最も好ましいのは、アミドおよびエステル連結である。

【0012】

これらの連結を形成する方法は、合成有機化学の当業者に周知であり、そして例えば、March, Advanced Organic Chemistry, Wiley Interscience (1992) のような標準的な教科書において見出され得る。

【0013】

PGに対するカンプトセシンの充填の程度は、ポリグルタミン酸ポリマー鎖当たりの分子の数として、または好ましくは結合体の総重量の% (「%充填」) として表わされる。所定の結合体および所定の用途のための最適な充填の程度は、この結合体の所望の特性(例えば、水溶性、治療効力、薬物動態学的特性、毒性

、および用量要求)に基づいて経験的に決定される。

【 0 0 1 4 】

P G -カンプトセシン結合体の%充填は、(調製方法)で以下に記載されるようにして測定され得る。

【 0 0 1 5 】

カンプトセシンまたはカンプトセシンアナログは、ネイティブの分子にすでに存在する官能基によりポリマーに結合し得るか、そうでなければ薬剤の活性を変化させずに合成有機化学における周知の手順により導入され得る。本明細書中で与えられる実施例において、そして表3に示されるように、カンプトセシンは、その非結合体化形態において比較的水不溶性であり、そして結合体化後に大きく改善された溶解性を示す。しかし、水溶性アナログおよびプロドラッグ(例えば、アミノ酸エステル)でさえ、それらのポリグルタミン酸への結合体化後に優位性を示すと考えられる(例えば、非結合体化因子と比較しての改善された薬物動態力学および作用部位での保持力、増強された効果)。

【 0 0 1 6 】

「標準的なカップリング条件」の下で実施される反応は、カップリング剤および触媒の存在下で、 -20°C ~ 150°C 、好ましくは 0°C ~ 70°C 、より好ましくは 0°C ~ 30°C の温度にて、不活性溶媒(例えば、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、N-メチルピロリドン)中で実施される。もちろん、用いられる温度は、治療剤の安定性および結合基の反応性のような因子に依存する。適切なカップリング試薬は、合成有機化学において周知であり、そしてカルボジイミド、アルキルクロロホルメートおよびトリエチルアミン、ピリジニウム塩-トリブチルアミン、フェニルジクロロホスフェート、2-クロロ-1, 3, 5-トリニトロベンゼンおよびピリジン、ジ-2-ピリジルカルボネート、ポリステリルジフェニルホスフィン、(トリメチルシリル)エトキシアセチレン、1, 1'-カルボニルビス(3-メチルイミダゾリウム)トリフレート(triflate)、ジエチルアゾジカルボキシレートおよびトリフェニルホスフィン、N, N'-カルボニルジイミダゾール、メタンスルホニルクロリド、ピバロイルクロリドなどを含むがこれらに限定されない。アルコールカップリングのための適切な

触媒として、例えば、4-N, Nジメチルアミノピリジンおよび4-ピロリジノピリジンが挙げられる。本明細書で使用する場合、用語「不活性溶媒」は、それと共に記載される反応条件下で不活性な溶媒を意味し、例えば、ベンゾン、トルエン、アセトニトリル、テトラヒドロフラン（「THF」）、ジメチルホルムアミド（「DMF」）、クロロホルム（「CHCl₃」）、メチレンクロリド（もしくはジクロロメタンまたは「CH₂Cl₂」）、ジエチルエーテル、エチルアセテート、アセトン、メチルエチルケトン、ジオキサン、ピリジン、ジメトキシエタン、*t*-ブチルメチルエーテルなどが挙げられる。反対の記載がない限り、本発明の反応において用いられる溶媒は、不活性溶媒である。

【 0 0 1 7 】

複数の官能基がカンプトセシンに存在する場合、代表的に、ポリグルタミン酸ポリマーへの特定の官能基の選択的な結合は、適切な保護基の使用を必要とする。用語「保護基」または「ブロック基」は、化合物の1つ以上のヒドロキシル基、チオール基、アミノ基、またはカルボキシル基に結合される場合、これらの基で反応が生じるのを防ぎ、そして保護基が、ヒドロキシル基、チオール基、アミノ基、またはカルボキシル基を回復させる従来の化学的または酵素的工程により除去され得る任意の基をいう。一般的には、Greene and Wuts PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, 1999 (John Wiley and Sons, N. Y.) を参照のこと。

【 0 0 1 8 】

用いられる特定の除去可能なブロック基は重要ではなく、そして好ましい除去可能なヒドロキシルブロック基としては、アリル基、ベンジル基、アセチル基、クロロアセチル基、チオベンジル基、ベンジリジン基、フェナシル基、*t*-ブチルジフェニルシリル基、*t*-ブチルジメチルシリル基、トリエチルシリル基、MOM（メトキシメチル）基、MEM（2-メトキシエトキシメチル）、およびヒドロキシル官能基に化学的に導入され得、そして後に、生成物の性質に適合する穏やかな条件での化学的または酵素的方法により選択的に除去され得る任意の他の基のような従来の置換基が挙げられる。

【 0 0 1 9 】

好ましい除去可能なアミノブロック基として、*t*-ブチルオキシカルボニル (*t*-B O C)、ベンジルオキシカルボニル (C B z)、フルオレニルメトキシカルボニル (F M O C)、アリルオキシカルボニル (A L O C)、トリクロロエトキシカルボニル (T R O C) などのような従来の置換基が挙げられる。これらは、生成物の性質と適合する従来の条件により除去可能であり得る。好ましいカルボキシ保護基として、生成物の性質と適合する穏やかな加水分解条件により除去され得るメチル基、エチル基、プロピル基、*t*-ブチル基などのようなエステルが挙げられる。

【 0 0 2 0 】

(命名法)

本発明の P G -カンブトセシン結合体は、表 1 において例示的な結合体として示されるように命名される。表 1 で用いられる命名法はまた、図 1 を参照することによっても理解され得る。

【 0 0 2 1 】

【 表 1 】

表 1

化合物	PG 結合体
1	PG-CPT (20-系結合体)
2	PG-(10-OAc-CPT) (20-系結合体)
3	PG-(10-OH-CPT) (20-系結合体)
4	PG-gly-CPT (20-系結合体)
5	PG-gly-gly-CPT (20-系結合体)
6	PG-gly-gly-gly-CPT (20-系結合体)
7	PG-ala-CPT (20-系結合体)
8	PG-(D-ala)-CPT (20-系結合体)
9	PG-(4-NH-ブチル)-CPT (20-系結合体)
10	PG-(2-O-アセチル)-CPT (20-系結合体)
11	PG-(4-O-アセチル)-CPT (20-系結合体)
12	PG-(D-gluc)-CPT (20-系結合体)
13	PG-(10-O-CPT) (10-系結合体)
14	PG-gly-(10-O-CPT) (10-系結合体)
15	PG-(9-NH-CPT) (9-系結合体)
16	PG-gly-(9-NH-CPT) (9-系結合体)
17	PG-gly-(10-OH-CPT) (20-系結合体)
18	PG-gly-(7-Et-10-OH-CPT) (20-系結合体)
19	PG-gly-(7-t-BuMezSi-10-OAc-CPT) (20-系結合体)

(好ましい実施形態の詳細な説明)

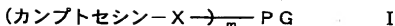
(A. 結合体)

本発明は、薬学的に活性なポリグルタミン酸-カンプトセシン結合体を包含し

、この結合体は、一般式 I および特定の式 I I ~ V I I により特徴付けられる：

[0 0 2 2]

[化 1 2]



ここで：

PGは、ポリグルタミン酸ポリマーであり；

Xは、単結合か、アミノアシリリンカー $\text{---}[\text{OC---}(\text{CHR}')_n\text{---NH}]_n$ 。

一か、またはヒドロキシアシリリンカー $\text{---}[\text{OC---}(\text{CHR}')_n\text{---O}]_n$ 。一

であり、ここで、R'は、天然に存在するアミノ酸の側鎖であり；

カンプトセシンは、20(S)-カンプトセシンまたは生物学的に活性な20

(S)-カンプトセシンアナログであり；

mは、5～65の正の数であり；

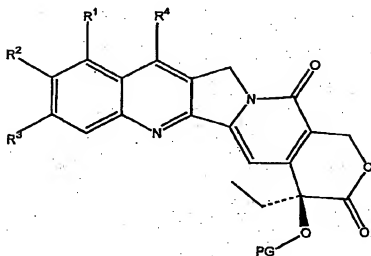
カンプトセシン-Xは、エステル連結またはアミド連結を通じて上記ポリマーのカルボキシル基と共有結合的に連結しており；

nは、1と10との間の整数であり、最も好ましくは1と3との間の整数であり；そして

pは、1と10との間の整数であり、最も好ましくは1と3との間の整数である；

[0023]

[化13]



II;

ここで、 R^1 、 R^2 、 R^3 、および R^4 はそれぞれHであるか；または
 R^1 は $-NH_2$ であり、そして R^2 、 R^3 、および R^4 はそれぞれHであるか；

または

R^1 は $-NO_2$ であり、そして R^2 、 R^3 、および R^4 はそれぞれHであるか；

または

R^1 、 R^3 、および R^4 はそれぞれHであり、そして R^2 は $-OH$ であるか；ま

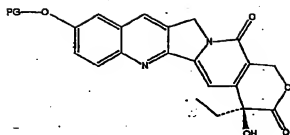
たは

R^1 、 R^3 、および R^4 はそれぞれHであり、そして R^2 は $-O-C(O)-C$
 H_3 であるか；または

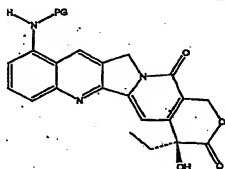
R^1 および R^3 はそれぞれHであり、 R^4 は $-SiMe_2t-Bu$ であり、そし
て R^2 は $-OH$ である；

[0 0 2 4]

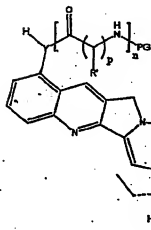
[化 1 4]



III;



IV;

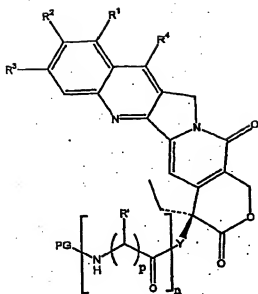


V;

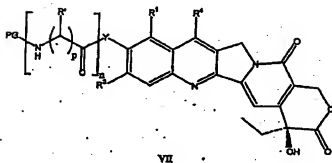
ここで、Yは、NまたはOである；

【 0 0 2 5 】

【 化 1 5 】



VI: および



VII

ここで：

Y は、N または O であり；

R' は、天然に存在するアミノ酸の側鎖であり；

R¹ は、-NH₂ または H であり；

R² は、-H、-OH、または -O-C(=O)-CH₃ であり；

R³ は、-H またはアルキルであり；そして

R⁴ は、-H、アルキル、またはトリアルキルシリルである。

【 0 0 2 6 】

本明細書中で使用される場合、用語「アルキル」は、脂肪族炭化水素基をいう。このアルキル基は、1～20個の炭素原子を有する（本明細書中に表れる場合、例えば「1～20」のような数字範囲は、所定の範囲におけるそれぞれの整数

をいう；例えば、「1～20個の炭素原子」は、1個の炭素原子、2個の炭素原子、3個の炭素原子など、20個の炭素原子を含めて20個の炭素原子までからなり得ること意味するが、にもかかわらず本定義はまた、数字範囲を設計していない用語「アルキル」の存在をも包含する）。より好ましくは、1～10個の炭素原子を有する「中間」サイズのアルキルである。最も好ましくは、1～4個の炭素原子を有する「低級」アルキル（例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、*tert*-ブチル、*iso*-ブチル）である。このアルキル基は、置換されていても良いし、置換されていなくても良い。置換されている場合、この置換基は、好ましくは、ヒドロキシ基、アルコキシ基、メルカプト基、アルキルチオ基、シアノ基、ハロ基、カルボニル基、ニトロ基およびアミノ基から個々に、かつ独立して選択される1つ以上の基である。

【0027】

本明細書中で使用される場合、用語「トリアルキルシリル」は、基-Si（アルキル）₃をいい、ここで用語「アルキル」は上記に規定される。

【0028】

本発明の好ましい実施形態は、結合していないカンプトセシンまたはカンプトセシンアナログと比較して、有意な抗腫瘍活性、増強した水溶性、減少した毒性および増加した最大耐量（MTD）を示すPG-カンプトセシン結合体を含む。これらの結合体はまた、結合していない薬剤と比較して独特の薬物動態学的特性（例えば、増強した浸透性および腫瘍組織の保持、活性薬剤の持続された放出、長い生物学的半減期）を示し、そしてこの薬物のラクトン環形態（これはこれらの活性のために重要であることが公知である）を安定化することが期待される。さらに、PGの複数の可能な結合部位に対する結合によって高い不溶性カンプトセシンアナログを可溶化する能力は、高い活性であり得るがしかし現在それらの可溶性の問題に起因して使用され得ないカンプトセシンアナログの臨床的に有用な範囲を広げることが期待される。上記の処方に関して、式ⅠⅠおよび式ⅠⅡによって表されるPG-カンプトセシン結合体は、現在最も好ましく、

ここで：

R¹、R²、R³、R⁴ および R⁵ はそれぞれHであり；

R^1 、 R^2 および R^4 は、それぞれ H で、かつ R^3 は、 $-OH$ または $-O-C($

$O) - CH^3$ であり；

R^1 は、 $-NH_2$ および R^2 、 R^3 および R^4 はそれぞれ H であり；

そしてこの結合体は式 I V によって表される。

[0 0 2 9]

この結合体に使用されるポリグルタミン酸ポリマーは、水溶性であり、生分解性でかつ実質的に非免疫原性である。本発明の範囲内に含まれるポリグルタミン酸ポリマーは、上記に記載される（定義を参照のこと）。このポリグルタミン酸ポリマーの分子量は、代表的に 5000 ダルトンよりも大きく、好ましくは 20 kD ~ 80 kD、より好ましくは 25 kD ~ 60 kD（粘性によって決定される）である。現在最も好ましいものは、30 kD と 50 kD との間の分子量を有するポリー（L-グルタミン酸）ポリマーである。当業者は、分子量の値が、他の方法によって測定した場合と異なり得ることを理解する。これらの他の方法には、例えば、ゲル透過、低角度光散乱、複角度レーザー光散乱、屈折率およびそれらの組み合わせが挙げられ得る。

[0 0 3 0]

本発明の直接の結合体について、% 充填は、好ましくは約 7 % ~ 約 20 %、より好ましくは約 10 % ~ 約 17 %、そしてなおより好ましくは、約 12 % ~ 約 15 % の範囲である。この結合体が、アミノ酸リンカーを介して間接的に PG に結合するために、この % 充填は好ましくは約 7 % ~ 約 50 %、好ましくは約 15 % ~ 約 38 %、最も好ましくは約 20 % ~ 約 38 % である。

[0 0 3 1]

(B . 調製の方法)

本発明のポリグルタミン酸カンプトセシン結合体は、生物学的に活性なカンプトセシン化合物のポリグルタミン酸ポリマーへの直接的または間接的な結合によって調製される。任意のカンプトセシン化合物を使用得るが、但し、PG の γ カルボキシレート基に、好ましくはエステル結合またはアミノ結合を介して結合し得る基を含むか、またはこのような基によって官能基化され得る。例えば、Wangら、Med. Res. Rev. 17 : 367 ~ 425 (1997)、Lab

ergneおよびBigg, Bull. Cancer (Paris) 1:51~8 (1998) および以下の表2を参照のこと。従って、20(S)-カンプトセシンおよび生物学的に活性な20(S)-カンプトセシナアナログは、カンプトセシン核の20(S)-ヒドロキシル基を介して、またはアナログの別の利用可能な官能基を介して、PGに連結され得る。

【0032】

一般に、直接的に結合されたポリグルタミン酸カンプトセシン結合体は、ジメチルホルムアミドまたは他の不活性溶媒中のカンプトセシンおよびポリグルタミン酸を溶解すること、溶液を冷却すること、およびこの冷却した混合物に結合試薬および過剰のアミノ塩基（例えば、ジメチルアミノピリジン）を添加することによって調製される。驚くべきことに、結合試薬としての塩化ビス（2-オキソ-3-オキサゾリジニル）ホスフィン酸（BOP-Cl）またはヨウ化2-クロロメチルピリジニウムの使用は、当該分野で以前に公知であったものと比較して、20(S)-カンプトセシンまたは20(S)-カンプトセシナアナログの有意に増加した成分（すなわち、約10%~20%の範囲における%充填）を有する結合体の調製を可能にする。この発見は、それが組成物についてのPGポリマーに対する活性な薬物のモル比を大きく増加し、それによって患者への所定の薬物の投薬量を投与するのに必要なポリマーの総質量を減少するので、非常に重要である。これらの結合体の他の利点および新規の特徴は、本出願中の他のところに記載される。

【0033】

この反応混合物を温め、そして反応が約70%完了するまで進行するのに十分な時間攪拌した。この得られた結合体を、反応混合物を0℃と10℃との間に冷却して、この溶液から、塩水溶液（例えば、NaCl、KCl、NH₄Cl）、好ましくは10~15%塩溶液の過剰量を添加することによってこの結合体を沈殿させることで分離し、そしてこの結合体をプロトン化形態で固体として収集する。

【0034】

この結合体からの未反応のカンプトセシンの除去は、最小の毒性を有する本発

明の組成物の効力を高程度に保証するのに必要であることが見出されている。未反応のカンプトセシンおよび他の不純物は、未反応のカンプトセシンおよび他の不純物が溶解する（しかしこの結合体は溶解しない）有機溶媒（例えば、1～3%のメタノール-ジクロロメタン、1～3%のメタノール-クロロホルム、クロロホルム、ジクロロエタン、および他のもの）を用いてこの固体結合体を洗浄することによって抽出され得る。一般に、この結合体生成物中の未反応のカンプトセシンの存在は、この結合体を3時間、2%メタノール-ジクロロメタン中で超音波処理し、そして薄層クロマトグラフィー（TLC）によって有機抽出物中のカンプトセシンについて分析することによって決定され得る。この結合体の¹H NMRスペクトルは、カンプトセシンがPGに共有結合しているコンホメーションを提供する（選択された例示的な結合体のNMR分析についての表3を参照のこと）。

[0 0 3 5]

ポリマーに対する薬物充填の量を決定するために、直接的に結合体化したPG-カンプトセシンの一部分は、塩基を用いる加水分解に供されて、結合体化したカンプトセシンを放出し、これはまた、ラクトン環を遊離カルボン酸塩に開く。カルボキシレートをラクトンに再開鎖するための酸性化の後、この放出されたカンプトセシンを抽出した。従って、得られたカンプトセシンをカンプトセシンの確実なサンプルと、薄層クロマトグラフィー（TLC）および¹H NMRによって比較する。この%充填を、抽出物から回収されたカンプトセシンの量および生成物結合体の重量から計算する。この%充填はまた、PG-カンプトセシンのUV吸光度の測定およびカンプトセシン標準曲線からカンプトセシン含有量を計算することによって計算される。代表的に、この決定は364nmで実行される。しかし、当業者は、単なる慣用的な実験を用いて、この決定のための最適波長を決定し得る。

[0 0 3 6]

複数の官能基が結合のために利用可能な場合、ポリグルタミン酸ポリマーに対するこの薬物の特定の基の選択的結合は、基の示差的反応に依存する適切な保護基の使用を必要とし得る。適切な保護基の非限定的な例は、アセチル基である。

当業者に公知な他の適切な保護基は、例えば、GreeneおよびWuts、(~に引用される)に記載される。

[0 0 3 7]

ピリジン塩基の存在における無水酢酸のような活性アシルドナーでの20(S)-10-ヒドロキシカンプトセシンの処理は、独占的に10-ヒドロキシ基で反応した。次いで、この10-アセトキシ誘導体は、20(S)-ヒドロキシルを介してPGと結合した。アセテートを、ブロッキング基として選択した。なぜなら、これはインビボで加水分解され、そして薬学的に受容可能と期待されるからである。あるいは、この10-ヒドロキシ基を、移動可能な保護基(例えば、BOC)によって、PGに結合する前に保護し得、次いでトリフルオロ酢酸処理で脱保護した(以下の実施例3を参照のこと)。ブロッキング基の非存在において、ジメチルホルムアミド中のヨウ化クロロメチルピリジニウム/4-ジメチルアミノピリジン/PG-Hを使用するPGと20(S)-10-ヒドロキシカンプトセシンとの反応は、独占的生成物としてPG-(10-O-CPT)を生成した。

[0 0 3 8]

直接的結合の条件下(ヨウ化クロロメチルピリジニウムおよび4-ジメチルアミノピリジン)で、20(S)-9-アミノカンプトセシンのPGとの結合は、独占的生成物としてPG-9-NH-CPTを生成する場合において、芳香族A環ヘテロ原子置換基で起こった。この結果は、20(S)-9-アミノカンプトセシンのBoc-L-グルタミン酸 α -tert-ブチルエステルとの類似の結合(¹H-NMRスペクトルが、20(S)-9-アミノカンプトセシン芳香族プロトンに起因してシグナルの特徴的な移動を示すが、ラクトンエチルプロトンに起因するシグナルは移動しないという生成物を生成する)の結果に基づいて推測された。

[0 0 3 9]

本発明に含まれるPG-カンプトセシン結合体はまた、20(S)-カンプトセシンまたは20(S)-カンプトセシンアナログと、PGポリマーの α または γ カルボキシ基との間に二官能基リンカーを挿入することによって調製され得る

。好ましいリンカーは、天然に存在するアミノ酸、 β -アミノ酸、 γ -アミノ酸またはヒドロキシ酸、より好ましくはグリシンリンカーである。リンカーの使用は、直接的な結合体よりも、さらに大きい%充填を有する20(S)-カンプトセシンおよびそのアナログとの効果的な結合体を提供する。間接的結合体は、一般に、公知の手順（例えば、米国特許第5,646,159号およびGreenwaldら、Bioorg. Med. Chem., 6:551~562(1998)を参照のこと）に従って、アミノ酸エステルまたは20(S)-カンプトセシンのヒドロキシエステルもしくは所望の20(S)-カンプトセシンアナログを、PGの α または γ カルボキシ基に、アミノ酸のアミノ基またはヒドロキシ酸のヒドロキシ基を介して、それぞれアミドまたはエステル結合を形成する標準結合条件下で、調製される。

【0040】

PGへの20(S)-10-ヒドロシカンプトセシンの、20(S)-ヒドロキシ基に結合するグリシンリンカーを介する結合は、20(S)-10-ヒドロシカンプトセシンをジ-tert-ブチルジカルボネートおよびピリジンを用いて処理して、独占的に対応する10-O-Boc誘導体を提供することによって達成された。後者は、カルボジイミド結合試薬（例えば、ジイソプロピルカルボジイミド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド）および4-ジメチルアミノピリジンを使用する、Boc-グリシンでの20-O-アシル化である。トリフルオロ酢酸を用いる両方のBoc保護基の除去に続いてPGとの結合によって、PG-gly-(10-OH-CPT)を提供した。PG-gly-(7-Et-10-OH-CPT)およびPG-gly-(7-t-BuMe₂Si-10-OAc-CPT)は、この方法を使用して合成された。

【0041】

PGへの20(S)-10-ヒドロシカンプトセシンの、10-ヒドロキシ基に結合するグリシンリンカーを介する結合は、以下に行う。対称的なBoc-グリシンの無水物およびピリジンでの20(S)-10-ヒドロシカンプトセシンの処理は、対応する10-(N-Boc)-グリシン酸エステルのみ

を生成した。後者のトリフルオロ酢酸での処理は、N-Boc保護基の切断を生じた。この生じた20(S)-10-ヒドロキシカンプトセシンの10-グリシン酸エステルを、1,3-ジイソプロピルカルボジイミドおよび4-ジメチルアミノピリジンを使用して、PGと結合体化し、PG-gly-(10-O-CPT)を得た。

[0042]

グリシンの α -アミノ基への独占的な結合は、同じ反応条件下で、N-Boc-L-グルタミン酸 α -tert-ブチルエステルとの、20(S)-10-ヒドロキシカンプトセシンの10-グリシン酸エステルの類似の結合に基づいて推測された。この反応生成物の ^1H NMRスペクトルは、20(S)-10-ヒドロキシカンプトセシンの芳香族プロトンに起因するシグナルの特徴的な移動を示したが、ラクトンエチル基プロトンに起因するシグナルは移動しなかった。

[0043]

PGへの20(S)-9-アミノカンプトセシンの9-アミノ基に結合するグリシンリンカーを介する結合の最初の2つの工程は、Wallら、J. Med. Chem. 36:2689~2700(1993)に記載される方法によって達成され得る。20(S)-9-(グリシルアミノ)カンプトセシントリフルオロ酢酸塩のPGへの結合は、ジイソプロピルカルボジイミドおよびジメチルアミノピリジンの存在下において実行されて、PG-gly-(9-NH-CPT)を提供した。

[0044]

グリシル-グリシン(gly-gly; di-gly)リンカーを使用するPGの20(S)-カンプトセシンへの結合は、カルボジイミド結合試薬存在下で、20-O-(グリシル)カンプトセシントリフルオロ酢酸塩のN-(tert-ブトキシカルボニル)グリシンとの、最初の反応によって達成されて、20-O-(N-(tert-ブトキシカルボニル)グリシル)グリシル-カンプトセシンを提供した。次いで、後者をトリフルオロ酢酸で処理し、20-O-(グリシル-グリシル)カンプトセシントリフルオロ酢酸塩を得た。次いで、N,N-ジメチルアミノピリジンおよび1,3-ジメチルカルボジイミドの存在下に

において、20-O-（グリシル-グリシル）カンプトセシントリフルオロ酢酸塩をポリ-L-グルタミン酸と反応させて、PG-gly-gly-CPTを得た。

【0045】

グリシル-グリシル-グリシン (gly-gly-gly; tri-gly) リンカーを使用する、20(S)-カンプトセシンへのPGの結合は、N,N-ジメチルアミノピリジンおよび1,3-ジイソプロピルカルボジイミドの存在下で、((N-(tert-ブトキシカルボニル)グリシル)グリシル)-グリシンおよび20(S)-カンプトセシンの反応によって達成されて、20-O-((N-(tert-ブトキシカルボニル)グリシル)グリシル)グリシル)カンプトセシンを提供した。次いで、20-O-(((N-(tert-ブトキシカルボニル)グリシル)グリシル)グリシル)カンプトセシンを、トリフルオロ酢酸で処理され、20-O-(グリシル-グリシル-グリシル)カンプトセシントリフルオロ酢酸塩を生成した。後者を、N,N-ジメチルアミノピリジンおよび1,3-ジイソプロピルカルボジイミドの存在下で、ポリ-(L-グルタミン酸)(956mg)と反応させて、PG-gly-gly-gly-CPTを生成した。

【0046】

本発明のPG-カンプトセシン結合体は、種々の腫瘍（ヒト肺癌、ヒト非小細胞肺癌、乳癌、卵巣癌および黒色腫を含む）に対する抗腫瘍活性を示す（実施例20を参照のこと）。これらの結合体が、哺乳動物（ヒトを含む）の癌（固体癌（例えば、肺癌、卵巣癌、乳癌、胃腸癌、結腸癌、膵臓癌、膀胱癌、腎臓癌、前立腺癌、脳癌）を含む）および種々の造血の癌（例えば、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、白血病）の広い範囲に対して活性であると考えられる。これらの結合体はまた、薬物耐性癌の処置において有用であり得ると考えられる。

【0047】

本発明のPG-カンプトセシン結合体を含む薬学的組成物は、本発明の範囲に含まれる。これらの薬学的組成物は、インビボで抗腫瘍活性を示すことにおいて効果的な、任意の量の結合体を含み得る。医療の当業者の臨床医は、患者に投与

される投薬量は、年齢、体重および患者の体調、投与の経路、処置される特異的な癌、腫瘍の発達の段階などに従って変更されることを知っている。任意の特定の被験体について、特異的な投薬量レジメン（投薬量および投与の頻度の両方）は、当業者によってその患者のために調整されるべきである。結合体のインビボ投与（好ましくは、非経口投与または静脈内投与）について効果的であると考えられる投薬量は、体重1kg当たり一日につき約0.1～100mg当量の範囲のカンプトセシンまたはカンプトセシンアナログであり、好ましくは、体重1kg当たり一日につき1～60mg当量のカンプトセシンまたはカンプトセシンアナログである。この薬学的組成物は、薬学的に有効量のカンプトセシン結合体を、薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤中に含む。薬学的組成物の有効量の決定は、当業者の能力の十分な範囲内である。治療の使用のための受容可能なキャリアまたは希釈剤は、薬学的分野において周知であり、そして例えば、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES、MacK Publishing Co.（A. R. Gennaro編、1985）に記載される。防腐剤、安定剤、色素および他の薬剤が、この薬学的組成物に提供され得る。PG-カンプトセシン結合体を、他の薬物（他の抗腫瘍薬物を含むがこれらに限定されない）との、および放射線との併用治療において投与することは、本発明の範囲内である。

【0048】

処置される特定の状態に依存して、このような薬学的組成物は処方され得、そして全身または局所的に投与され得る。処方および投与のための技術は、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES、前述において見出され得る。適切な経路としては、経口投与、直腸投与、経皮投与、経臓投与、経粘膜投与または腸管投与；非経口的送達（筋肉内注入、皮下注入、髄内注入、ならびにくも膜下注入、直接脳室内注入、静脈内注入、腹腔内注入、鼻腔内注入または眼内注入）が挙げられ得る。

【0049】

注入のために、本発明の薬学的組成物は、水溶液で、好ましくは薬学的に適合性の緩衝液（例えば、生理学的生理食塩水緩衝液）で処方され得る。全身投与に

適切な単位投薬量における本発明の実行について、本明細書中に開示される薬学的組成物を処方するための薬学的に受容可能なキャリアの使用は、本発明の範囲内である。

【 0 0 5 0 】

本発明は、以下の実施例によって例示され、これはいかなるようにも本発明の限定と見なされるべきではない。

【 0 0 5 1 】

(実施例)

以下の実施例において、結合体を調製するために使用されるポリグルタミン酸の分子量は、粘度測定に基づいて、供給者 (S i g m a) によって特定された分子量である。さらに、実施例の数字は、図 1 における化合物の数字に対応する。

【 0 0 5 2 】

(実施例 1)

(P G - C P T (方法 1))

予め真空下で 4 時間乾燥した、20 (S) - カンプトセシン (132 mg , 0.38 mmol) とポリ (L - グルタミン酸) (33 kD , 530 mg) との混合物に、無水ジメチルホルムアミド (20 ml) を添加した。この溶液を、氷浴中で冷却し、そしてビス (2 - オキソ - 3 - オキソゾリニジル) 塩化ホスフィン (174 mg , 0.68 mmol) 、 N , N - ジメチルアミノピリジン (167 mg , 1.37 mmol) およびジイソプロピルエチルアミン (74 mg , 0.57 mmol) を添加した。この反応混合物を、室温に温めた。2 日間攪拌後、この混合物を、氷浴中で冷却し、そして 10 % の塩化ナトリウム水溶液 (45 ml) を、25 分間かけて添加した。この混合物を、0.5 M の塩酸 (3.5 ml) の添加によって pH 2.5 に酸性化し、そして、室温で 1 時間攪拌した。この沈殿物を濾過し、水 (4 × 50 ml) で洗浄し、そして真空下で 12 時間乾燥した。この固体を、粉末にすりつぶし、そして 2 % のメタノール - ジクロロメタン (10 ml) 中に懸濁した。3 時間の攪拌後、この固体を、遠心分離によって分離し、そして上清を捨てた。この洗浄工程を 4 回繰り返し、未反応のカンプトセシンの完全な除去をもたらした。この固体を、真空下で 2 日間乾燥して、P G

-PCTを得た(521mg、回収した20(S)-カンプトセシン(64.5mg)の重量に基づく87%物質収支)。¹H NMR(DMSO-d₆において300MHz): δ 12.10(s, -COOH)、6.90-8.80(m)、5.15-5.8(m)、3.10-4.35(m)、1.42-2.62(m)、0.90(br s, 19-CH₃)。PG-CPTのサンプル中の20(S)-カンプトセシンの充填%重量(% weight loading)を、以下のように決定した。メタノール-水(1:1、4ml)中のPG-PCT(100mg)の懸濁物に、1Mの塩化ナトリウム水溶液(2ml)を添加した。この黄色溶液を16時間攪拌し、1Mの塩酸の添加によってpH5まで酸性化し、そしてジクロロメタン(4×20ml)で抽出した。この合わせた有機抽出物を、硫酸マグネシウムで乾燥し、そして減圧下で濃縮して、20(S)-カンプトセシン(13mg)を得た。このサンプルのプロトンNMRおよびTLCは、20(S)-カンプトセシンの信頼できるプロトンNMRおよびTLCと同一であった。これらの結果に基づいて、PG-PCTのサンプル中の20(S)-カンプトセシンの充填%重量は、13%であった。

[0 0 5 3]

(PG-PCT (方法2))

真空中で6時間乾燥した、20(S)-カンプトセシン(64mg、0.18mmol)とポリ-(L-グルタミン酸)(50kD、256mg)との混合物に、無水ジメチルホルムアミド(15ml)を添加する。氷/塩浴中で-5℃に溶液を冷却後、2-クロロメチルピリジニウムヨード(85mg、0.33mmol)およびN,N-ジメチルアミノピリジン(81mg、0.66mmol)を、アルゴンの雰囲気下で添加した。この反応混合物を、室温まで温めた。4日間攪拌後、この混合物を0℃に冷却し、そして10%の塩化ナトリウム水溶液(35ml)を25分間かけて添加した。この混合物を、0.5Mの塩酸(3.5ml)の添加によってpH2.5に酸性化し、そして、室温で、1時間攪拌した。この沈殿物を濾過し、水(4×30ml)で洗浄し、そして真空中で乾燥した。この固体を、粉末にすりつぶし、そして2%のメタノール-ジクロロメタン(10ml)中に懸濁した。3時間の攪拌後、この固体を、遠心分離によって分離

し、そして上清を捨てた。この洗浄工程を4回繰り返し、未反応のカンプトセシンの完全な除去をもたらした。この固体を、真空下で乾燥して、PG-PCTを得た(295mg、回収した20(S)-カンプトセシン(13mg)の重量に基づく97%の物質収支)。¹H NMR(DMSO-d₆において300MHz) ; δ 12.10 (s, -COOH)、6.90-8.80 (m)、5.15-5.8 (m)、3.10-4.35 (m)、1.42-2.62 (m)、0.90 (br s, 19-CH₃)。

【0054】

方法1によるPG-PCT合成において上記される方法を使用して、PG-CPPTのサンプル中の20(S)-カンプトセシンの充填%重量を、16%と決定した。

【0055】

(実施例2)

(PG-10-OAc-CPPT)

20(S)-10-アセトキシカンプトセシンを、米国特許第4,545,880号(Miyasakaら)(これらの全体が本明細書中において参考として援用される)に記載される方法に従って調製した。

【0056】

ジメチルホルムアミド(8ml)中のポリ-(L-グルタミン酸)(50kD、235mg)および10-アセトキシカンプトセシン(53mg、0.13mmol)の懸濁物を、穏やかに温めながら溶解した。得られた溶液を、室温で冷却した場合、ジメチルホルムアミド(2ml)中のクロロメチルピリジニウムヨード(75mg、0.29mmol)の溶液と、ジメチルホルムアミド(2ml)中の4-ジメチルアミノピリジン(73mg、0.60mmol)の溶液を順に添加した。18時間の攪拌後、この混合物を、氷浴中で冷却し、そして10%の塩化ナトリウム水溶液(30ml)を、激しく攪拌しながら30分間かけて添加した。0.5Mの塩酸をゆっくり添加することによってpH1-2に酸性化した後、この混合物を、室温まで温め、そしてさらに30分間攪拌した。この固体を、遠心分離によって収集し、そして上清を捨てた。この固体を、水(200ml

1) 中に懸濁し、遠心後に再び単離した。この洗浄工程を、2回繰り返し、そしてこの固体を、真空下で乾燥した。2%のメタノール-クロロホルム(25 ml)中の固体の懸濁物を、90分間超音波処理し、そして濾過した。この洗浄工程を、繰り返し、そしてこの固体を、真空下で乾燥して、黄色粉末としてPG-(10-OAc-CPT)(174 mg, 61%の物質収支)を得た。¹H NMR(300 MHz, d₆-DMSO); 7.2-8.5(複数広域シグナル, Ar-H) 5.45, 5.20(br, s, C-17, C-5 CH₂), 0.85(br, 三重線, C-18 CH₃)。

[0057]

(実施例3)

(PG-(10-OH-CPT))

ジメチルホルムアミド(8 ml)中の20(S)-10-ヒドロキシカンブトセシン(317 mg, 0.87 mmol)およびピリジン(1.5 ml)の溶液に、ジメチルホルムアミド(2 ml)中のジ-tert-ブチル-ジカルボネート(328 mg, 1.5 mmol)の溶液を加えた。室温で3時間攪拌後、この混合物を、クロロホルム(100 ml)と水(100 ml)との間に分配した。クロロホルム相を、1Mの塩酸(2×100 ml)で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、そして減圧下で濃縮した。この固体を、再結晶(クロロホルム-ヘキサン)して、黄色粉末として20(S)-10-tert-ブトキシカルボニルオキシカンブトセシン(358 mg, 91%収率)を得た。¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) 8.34(s, 1H), 8.23(d, J=8 Hz, 1H), 7.75(d, J=2 Hz, 1H), 7.67(s, 1H), 7.66(dd, J=8, 2 Hz, 1H), 5.75(d, J=17 Hz, 1H), 5.31(d, J=17 Hz, 1H), 5.27(s, 2H), 1.91(sep., J=6 Hz, 2H), 1.62(s, 9H), 1.06(t, J=6 Hz, 3H)。ジメチルホルムアミド(20 ml)中のポリ-(L-グルタミン酸)(507 mg, 3.9 mmol 遊離カルボキシレート)と20(S)-10-tert-ブトキシカルボニルオキシカンブトセシン(103 mg, 0.23 mmol)の懸濁物を、穏やかに攪拌しながら溶解した。得られた溶液を、室温

に冷却した場合、ジメチルホルムアミド (2.5 ml) 中のクロロメチルピリジニウムヨード (129 mg, 0.5 mmol) の溶液とジメチルホルムアミド (2.5 ml) 中の4-ジメチルアミノピリジン (131 mg, 1.1 mmol) の溶液を順に添加した。80時間攪拌後、この混合物を、氷浴において冷却し、10%の塩化ナトリウム水溶液 (65 ml) を激しく攪拌しながら30分間かけて添加した。0.5 Mの塩酸をゆっくり添加することによってpH 1-2に酸性化した後、この混合物を、室温まで温め、そしてさらに30分間攪拌した。この固体を、遠心分離によって収集し、そして上清を捨てた。この固体を、水 (200 ml) に懸濁し、遠心後に再び単離した。この洗浄工程を、2回繰り返し、そしてこの固体を、真空下で乾燥した。2%のメタノールクロロホルム (25 ml) 中の固体の懸濁物を、90分間超音波処理し、そして濾過した。この洗浄工程を、繰り返し、そしてこの固体を、真空下で乾燥し、黄色粉末としてPG-(10-tert-ブチルカルボニルオキシカンプトセシン) (20結合化) (471 mg, 78%の物質収支) を得た。充填%を、メタノールクロロホルム洗浄溶液から回収された20(S)-10-tert-ブチルカルボニルオキシカンプトセシン (53 mg) の重量に基づいて、10%と決定した。¹H NMR (300 MHz, d₆-DMSO) δ 7.2-8.5 (複数広域シグナル, Ar-H), 5.45, 5.20 (br. s, C-17, C-5 CH₂), 1.55 (s, 10-O-Boc), 0.85 (br, C-18 CH₃)。

[0058]

PG-(10-tert-ブチルカルボニルオキシカンプトセシン) (20結合化) (288 mg) を、30分間かけてトリフルオロ酢酸 (50 ml) に4つに分割して添加した。24時間の攪拌後、この混合物を、真空下で濃縮して、PG-(10-OH-CPT) (251 mg, 87%の物質収支) を得た。¹H NMRスペクトルの積分は、5%の充填を示す。¹H NMR (300 MHz, TFA-d) δ 9.15 (br. s., Ar-H); 7.2-8.5 (多重広域シグナル, Ar-H) 5.6-6.0, (多重シグナル, C-17, C-5 CH₂); 1.05 (br. 三重線, C-18 CH₃)。

[0059]

(実施例4)

(PG-gly-CPT)

氷浴(4-6℃)において冷却した、20(S)-カンプトセシン(1.70 g、4.88 mmol)、N-(tert-ブチオキシカルボニル)-グリシン(12.82 g、73.2 mmol)および無水ジメチルホルムアミド(170 ml)の混合物に、15分かけて4-ジメチルアミノピリジン(7.75 g、63.5 mmol)ポーションワイズ(portionwise)を添加後、20分かけて1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(14.03 g、73.2 mmol)ポーションワイズを添加した。5-10℃(氷/水浴)において3.5時間攪拌後、この混合物を、氷浴(4℃)で冷却し、そして水(275 ml)を、激しく攪拌しながら30分かけて添加した。さらに15間の攪拌後、この固体を濾過し、洗浄し、そして水(2×150 ml)、氷冷した0.1 Mの塩酸(300 ml)および水(3×100 ml)で洗浄した。20時間の凍結乾燥後、この固体を、酢酸エチル-メタノール(1:4、500 ml)から再結晶した。濾過後、この固体を、氷冷メタノール(2×100 ml)で洗浄後、乾燥して、20-O-(N-(tert-ブチルオキシカルボニル)グリシル)カンプトセシン(22.5 g、91%収率)を得た。プロトンNMRは、信頼できるサンプルのプロトンNMRと同一であった。

[0060]

氷浴中で冷却した、無水酢酸エチル(125 ml)中の20-O-(N-(tert-ブチルオキシカルボニル)グリシル)カンプトセシン(48.6 g、93.6 mmol)の懸濁液に、30分かけてトリフルオロ酢酸(250 ml)を添加した。3.5時間後、溶媒を、減圧下でエバポレートした。ヘキサン-メタノール-酢酸エチル(1:2:20、575 ml)からの再結晶は、固体を得、これを、濾過し、酢酸エチル(150 ml)で洗浄し、そして真空中で乾燥して、黄色粉末として20-O-(グリシル)カンプトセシントリフルオロ酢酸塩(46.4 g、93%収率)を提供する。¹H NMR (TFA-d) δ 9.35 (s, 1H)、8.25-8.45 (m, 3H)、8.05 (t, J = 7.3 Hz, 1H)、7.82 (s, 1H)、5.80 (d, J = 18.1 Hz, 1H)

、 5. 70 (s, 2H)、 5. 55 (d, J = 18. 1 Hz, 1H)、 4. 42 (d, J = 17. 6 Hz, 1H)、 4. 30 (d, J = 17. 6 Hz, 1H)、 2. 10 - 2. 30 (m, 2H)、 1. 00 (t, J = 7. 4 Hz, 3H)。

【 0061 】

無水ジメチルホルムアミド (31 ml) 中のポリー (L-グルタミン酸) (1. 24 g) の溶液に、20-O- (グリシル) カンプトセシントリフルオロ酢酸塩 (1. 0 g, 1. 9 mmol) を添加した。0℃に冷却後、ジメチルアミノピリジン (707 mg, 5. 79 mmol) を少しずつ添加した後、ジメチルホルムアミド (1 ml) 中の1, 3-ジイソプロピルカルボジイミド (292 mg, 2. 32 mmol) の溶液を、20分間かけて添加した。この混合物を、室温で温めた。2日間攪拌後、この混合物を、氷浴中で冷却し、10%の塩化ナトリウム水溶液 (75%) を、30分間かけて添加した。この混合物を、1Mの塩酸の添加によってpH2. 5に酸性化した。室温まで1時間攪拌後、この固体を、濾過し、水 (4×100 ml) で洗浄し、そして真空下で乾燥した。この固体を、2%のメタノール-ジクロロメタン (75 ml) 中で懸濁し、1時間攪拌し、そして濾過した。この洗浄工程を、2%のメタノール-ジクロロメタン、アセトニトリル (100 ml) で1度で、そして水 (100 ml) で1度で、3回繰り返した。この固体を、2日間真空下で乾燥し、黄色粉末としてPG-gly-CPT (1. 88 g, 93% 物質収支) を得た。¹H NMR (TFA-dにおいて300 MHz) δ 9. 45 (s, C-7H)、8. 30-8. 52 (m, 芳香族プロトン)、8. 27 (t, J = 6. 6 Hz, 芳香族プロトン)、7. 95 (s, 芳香族プロトン)、5. 95 (d, J = 18. 3 Hz, ラクトンプロトン)、5. 72 (s, 5-H₂)、5. 60 (d, J = 18. 3 Hz, ラクトンプロトン)、4. 80 (br, s)、4. 30-4. 70 (m, グリシンメチレンプロトン)、2. 00-2. 70 (m)、1. 10 (br s)。

【 0062 】

(実施例5)

(PG-gly-gly-CPT)

無水ジメチルホルムアミド (50 ml) 中の20-O- (グリシル) カンプト

セシントリフルオロ酢酸塩 (2.60 g, 5.0 mmol) および N-(tert-ブトキシカルボニル) グリシン (2.63 g, 15.0 mmol) の混合物を 30 分間攪拌した後、氷浴中で冷却し、そして 4-ジメチルアミノピリジン (1.83 g, 15.0 mmol) を添加した。ジイソプロピルカルボジイミド (1.89 g, 15.0 mmol) を、30 分かけて添加し、この反応混合物を、室温まで温めた。16 時間の攪拌後、この混合物を、水 (100 ml) で処理し、そしてジクロロメタン (3 × 100 ml) で抽出した。合わせた有機抽出物を、水 (100 ml)、0.1 M の塩酸 (100 ml)、水 (100 ml) で洗浄し、そして無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下での濃縮後、残留物を、4 % のメタノール-ジクロロメタンで溶出しながらシリカゲルにおけるフラッシュクロマトグラフィーによって精製して、黄色粉末とし 2-O-((N-(tert-ブトキシカルボニル) グリシル) グリシル) カンプトセシン (1.30 g, 45 % 収率) を与えた。¹H NMR (CDCl₃) : δ 8.35 (s, 1H)、8.22 (d, J = 8.38 Hz, 1H)、7.91 (d, J = 8.07, 1H)、7.76-7.85 (m, 1H)、7.65 (t, J = 7.4 Hz, 1H)、7.26 (s, 1H)、7.10 (s, 1H)、5.70 (d, J = 17.25 Hz, 1H)、5.40 (d, J = 17.25 Hz, 1H)、5.25 (s, 2H)、5.10 (br s, 1H)、3.70-4.45 (m, 4H)、2.05-2.30 m (m, 2H)、1.38 (s, 9H)、0.95 (t, J = 7.47 Hz, 3H)。

[0063]

トリフルオロ酢酸-ジクロロメタン (1:1, 4 ml) 中の 2-O-((N-(tert-ブトキシカルボニル) グリシル) グリシル) カンプトセシン (1.20 g, 2.10 mmol) の溶液を、室温で 1 時間攪拌した。減圧下での溶媒のエバポレーション後、この残留物を、酢酸エチル (50 ml) と共に磨り潰した。この固体を、濾過し、ジクロロメタン (40 ml) で洗浄し、そして真空下で乾燥し、黄色粉末として 2-O-((グリシル) グリシル) カンプトセシントリフルオロ酢酸塩 (1.0 g, 82 % 収率) を得た。¹H NMR (TFA-d) : δ 9.45 (s, 1H)、8.10-8.50 (m, 3H)、7.95 (

s、1H)、5.90 (d、J=18.3 Hz、1H)、5.80 (s)、5.65 (d、J=18.3 Hz、1H)、4.10-4.60 (m、4H)、2.20-2.50 (m、2H)、1.10 (t、J=7.4 Hz、3H)。

【0064】

水浴中で冷却した、無水ジメチルホルムアミド (14.5 ml) 中の 20-O- (グリシル-グリシル) カンプトセシントリフルオロ酢酸塩 (220 mg、0.38 mmol) とポリ-L-グルタミン酸 (532 mg) との混合物に、N、N-ジメチルアミノピリジン (140 mg、1.15 mmol) を添加した。ジメチルホルムアミド (0.5 ml) 中の 1、3-ジイソプロピルカルボジイミド (58 mg、0.46 mmol) の溶液を 20 分かけて添加した。そして、この混合物を、室温まで温めた。アルゴン雰囲気下で 35 時間攪拌後、この混合物を、水浴中で冷却し、そして 10% の塩化ナトリウム水溶液 (35 ml) を、30 分かけて添加した。1 時間攪拌後、この混合物を、1 M の塩酸の添加によって pH 2.5 に酸性化した。この固体を濾過し、水 (3×75 ml) で洗浄し、真空下で乾燥し、2% のメタノール-ジクロロメタン (4×50 ml) で洗浄し、真空下で乾燥し、アセトニトリル (100 ml) で洗浄し、水 (100 ml) で洗浄し、そして真空下で乾燥して、黄色粉末として PG-gly-gly-CPT (625 mg、88% 物質収支) を提供する。¹H NMR (TFA-d₃において 300 MHz) : δ 9.45 (s、C-7H)、7.85-8.6 (芳香族プロトン)、5.92 (d、J=18.3 Hz、ラクトンプロトン)、5.70 (s)、5.62 (d、J=18.3 Hz、ラクトンプロトン)、4.20-5.10 (m)、3.2.10-2.90 (m)、1.00 (s)。

【0065】

(実施例 6)

(PG-gly-gly-gly-CPT)

0℃に冷却された、無水ジメチルホルムアミド (20 ml) 中の (N-(tert-ブトキシカルボニル) グリシル) グリシル) グリシン (1.99、6.88 mmol および 20 (S)-カンプトセシン (1.20 g、3.44 mmol) の溶液に、N、N-ジメチルアミノピリジン (630 mg、5.16 mmol)

1) を添加した。1, 3-ジイソプロピルカルボジイミド (0.98 g, 7.6 mmol) を、ゆっくりと添加し、そして反応混合物を、室温まで温めた。16 時間の攪拌後、混合物を、氷浴中で冷却し、水 (55 ml) で処理し、そしてジクロロメタン (3×50 ml) で抽出した。合わせた有機抽出物を、0.1 M の塩酸 (2×50 ml) および水 (2×50 ml) で順に洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下での溶媒のエバポレーション後、この残留物を、4% のメタノール-ジクロロメタンで溶出しながらシリカゲルにおけるフラッシュクロマトグラフィーによって精製して、浅黄色粉末として 20-O-((N-(tert-ブトキシカルボニル)グリシル)-グリシル)グリシル)カンプトセシン (1.52 g, 71% 収率) を得た。¹H NMR (CDCl₃): δ 8.40 (s, 1H)、8.25 (d, J=8.38 Hz, 1H)、7.91 (d, J=8.07, 1H)、7.76-7.85 (m, 1H)、7.65 (t, J=7.4 Hz, 1H)、7.26 (s, 1H)、7.05 (br s, 1H)、5.65 (d, J=17.25 Hz, 1H)、5.40 (d, J=17.25 Hz, 1H)、5.25 (s, 2H)、5.15 (br s, 1H)、3.70-4.45 (m, 6H)、2.15-2.35 (m, 2H)、1.45 (s, 9H)、0.95 (t, J=7.47 Hz, 3H)。

【0066】

トリフルオロ酢酸-ジクロロメタン (1:1, 5 ml) 中の 20-O-((N-(tert-ブトキシカルボニル)グリシル)グリシル)グリシル)カンプトセシン (1.50 g, 2.42 mmol) の溶液を、室温で1時間攪拌した。減圧下で溶媒のエバポレーション後、残留物を、酢酸エチル (30 ml) と共に磨り潰した。この固体を、濾過し、ジクロロメタン (50 ml) で洗浄し、そして真空中で乾燥して、黄色粉末として 20-O-(グリシル-グリシル-グリシル)カンプトセシントリフルオロ酢酸塩 (1.3 g, 85% 収率) を得た。¹H NMR (DMSO-d₆): δ 8.78 (s, 1H)、7.70-8.65 (m, 4H)、7.10 (s, 1H)、5.55 (s, 2H)、3.95-4.30 (m, 2H)、3.85 (s, 2H)、3.51 (s, 2H)、2.10-2.25 (m, 2H)、0.95 (t, J=7.4 Hz, 3H)。

【0067】

氷浴中で冷却した無水ジメチルホルムアミド(29.5ml)中の20-O-(グリシルーグリシル-グリシル)カンプトセシントリフルオロ酢酸塩(940mg, 1.49mmol)、およびポリー(L-グルタミン酸)(956mg)の混合物に、N,N-ジメチルアミノピリジン(545mg, 4.47mmol)を添加した。ジメチルホルムアミド(0.5ml)中の1,3-ジイソプロピルカルボジイミド(257mg, 1.78mmol)の溶液を、20分にわたって添加した。アルゴン雰囲気下で3日間攪拌した後、この混合物を、氷浴中で冷却し、そして10%の塩化ナトリウム水溶液(69ml)を、30分にわたって添加した。1時間の攪拌後、この混合物を、1Mの塩酸を添加することによってpH2.5に酸性化した。固体を濾過し、水(3×75ml)で洗浄し、真空下で乾燥させ、2%のメタノール-ジクロロメタン(3×50ml)で洗浄し、真空下で乾燥させ、アセトニトリル(100ml)で洗浄し、水(100ml)で洗浄し、そして真空下で乾燥させて、黄色の粉末としてPG-gly-gly-gly-CPT(1.50g, 87%の物質収支)を得た。¹H NMR(TFA-dにおいて300MHz): δ9.45(s, C-7H)、7.85~8.50(芳香族プロトン)、5.92(d, J=18.3MHz, ラクトンプロトン)、5.70(s)、5.62(d, J=18.3MHz, ラクトンプロトン)、4.10~5.00(m)、2.05~2.75(m)、1.05(s)。

【0068】

(実施例7)

(PG-a1a-CPT)

0℃で冷却した無水ジメチルホルムアミド(8ml)中のN-(tert-ブトキシカルボニルオキシ)アラニン(568mg, 3.0mmol)の溶液に、20(S)カンプトセシン(348mg, 1.0mmol)およびジメチルアミノピリジン(244mg, 2.0mmol)を添加した。1,3-ジイソプロピルカルボジイミド(379mg, 3.0mmol)をゆっくり添加し、そしてこの反応混合物を室温まで暖めた。16時間の攪拌後、この混合物を、水(50ml)で処理し、そしてジクロロメタン(4×40ml)で抽出した。合わせた有

機抽出物を、0.1 Mの塩酸(2×50 ml)、水(2×50 ml)、0.1 Mの重炭酸ナトリウム溶液(2×25 ml)、および水(2×50 ml)によって連続して洗浄した。硫酸ナトリウムで乾燥させた後、この溶媒を減圧下で蒸発させた。残渣を、2%のメタノール-ジクロロメタンで溶出するシリカゲルのフラッシュクロマトグラフィーによって精製し、黄色の粉末として20-O-(N-(tert-ブトキシカルボニルオキシ)アラニル)カンプトセシン(420 mg、収率81%)を提供した。¹H NMR(CDCl₃): δ 8.35(s, 1H)、8.22(d, J=8.38 Hz, 1H)、7.91(d, J=8.07, 1H)、7.76~7.85(m, 1H)、7.65(t, J=7.4 Hz, 1H)、7.26(s, 1H)、5.70(d, J=17.25 Hz, 1H)、5.40(d, J=17.25 Hz, 1H)、5.25(s, 2H)、4.95(br s, 1H)、4.45(br t, 1H)、2.05~2.30(m, 2H)、1.55(d, 3H)、1.45(s, 9H)、0.95(t, J=7.47 Hz, 3H)。トリフルオロ酢酸-ジクロロメタン(1:1, 2 ml)中の20-O-(N-(tert-ブトキシカルボニルオキシ)アラニル)カンプトセシン(300 mg, 0.57 mmol)の溶液を、室温で1時間攪拌した。減圧下での溶媒の蒸発後、残渣を、10%のメタノール-クロロホルム(12 ml)で粉碎した。濾過によって黄色の粉末として20-O-(アラニル)カンプトセシントリフルオロ酢酸塩(318 mg、収率87%)を提供し、これを、直ぐに次の反応に使用した。無水ジメチルホルムアミド(8.5 ml)中の20-O-(アラニル)カンプトセシントリフルオロ酢酸塩(114 mg, 0.21 mmol)、ポリ(L-グルタミン酸)(280 mg)およびN,N-ジメチルアミノピリジン(77 mg, 0.63 mmol)の攪拌された懸濁液に、ジメチルホルムアミド(0.5 ml)中の1,3-ジイソプロピルカルボジイミド(34.5 mg, 0.273 mmol)の溶液を、20分にわたって添加した。この混合物を、アルゴン雰囲気下で2日間攪拌した。氷浴中で冷却した後、10%の塩化ナトリウム水溶液(21 ml)を、30分にわたって添加した。1時間の攪拌後、この混合物を1Nの塩酸の添加によってpH 2.5に調節した。固体を濾過し、水(2×25 ml)で洗浄し、そして真空下で乾燥させた。この固体を2

%のメタノール-ジクロロメタン(4×50ml)で洗浄し、そして真空下で乾燥させて黄色の粉末としてPG-a1a-CPT(330mg、81%質量収支)を提供した。¹H NMR(TFA-dにおいて300MHz): δ 9.45(s, C-7H)、7.85~8.6(芳香族プロトン)、5.92(d, J=18.3Hz、ラクトンプロトン)、5.70(s)、5.62(d, J=18.3Hz、ラクトンプロトン)、4.80~6.05(m)、3.80~4.50(m)、1.20~2.80(m)、1.70(br s)、1.00(s)。

[0069]

(実施例8)

(PG-(β-a1a)-CPT)

0℃に冷却した無水ジメチルホルムアミド(8ml)中のN-tert-ブトキシカルボニル-β-アラニン(568mg、3.0mmol)の溶液に、20(S)-カンプトセシン(348mg、1.0mmol)およびジメチルアミノピリジン(244mg、2.0mmol)を添加した。1,3-ジイソプロピルカルボジイミド(379mg、3.0mmol)を、ゆっくりと添加し、そしてこの反応混合物を、室温まで暖めた。16時間の攪拌後、この混合物を、水(50ml)で希釈し、そしてジクロロメタン(4×40ml)で抽出した。合わせた有機抽出物を、0.1Mの塩酸(2×50ml)、水(2×50ml)、0.1Mの重炭酸ナトリウム溶液(2×25ml)、および水(2×50ml)によって連続して洗浄した。硫酸ナトリウムで乾燥させた後、この溶媒を減圧下で蒸発させた。残渣を、2%のメタノール-ジクロロメタンで溶出するシリカゲルのフラッシュクロマトグラフィーによって精製し、淡黄色の粉末として20-O-(N-tert-ブトキシカルボニル-β-アラニル)カンプトセシン(431mg、収率83%)を提供した。¹H NMR(CDCl₃): δ 8.35(s、1H)、8.22(d, J=8.38Hz、1H)、7.91(d, J=8.07、1H)、7.76~7.85(m、1H)、7.65(t, J=7.4Hz、1H)、7.26(s、1H)、5.70(d, J=17.25Hz、1H)、5.40(d, J=17.25Hz、1H)、5.25(s、2H)、5.

1.5 (br s, 1H), 3.30~3.50 (m, 2H), 2.55~2.80 (m, 2H), 2.15~2.25 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 0.95 (t, J = 7.47 Hz, 3H)。

【0070】

トリフルオロ酢酸-ジクロロメタン (1:1, 2ml) 中の 20-O-(N-tert-ブトキシカルボニル-β-アラニル) カンプトセシン (250mg, 0.48mmol) の溶液を、室温で1時間攪拌した。減圧下での溶媒の蒸発後、この残渣を、メタノール-ヘキサン-ジクロロメタン (1:2:7) で粉砕した。濾過によって、黄色の粉末として 20-O-(β-アラニル) カンプトセシントリフルオロ酢酸塩 (241mg, 収率94%) を得た。¹H NMR (DMSO-d₆): δ 8.87 (s, 1H), 8.05~8.50 (m, 2H), 7.60~7.94 (m, 2H), 7.15 (s, 1H), 5.55 (s, 2H), 5.30 (s, 2H), 2.80~3.60 (m, 4H), 2.15~2.25 (m, 2H), 1.00 (t, J = 7.4 Hz, 3H)。

【0071】

無水ジメチルホルムアミド (12.5ml) 中の 20-O-(β-アラニル) カンプトセシントリフルオロ酢酸塩 (241mg, 0.45mmol)、ポリ-L-グルタミン酸 (326mg)、および N,N-ジメチルアミノピリジン (165mg, 1.35mmol) の攪拌された混合物に、ジメチルホルムアミド (0.5ml) 中の 1,3-ジイソプロピルカルボジイミド (74mg, 0.59mmol) の溶液を、20分にわたって添加した。アルゴン雰囲気下での2日間の攪拌後、この混合物を氷浴中で冷却し、そして10%の塩化ナトリウム水溶液 (30ml) を、30分にわたって添加した。1時間の攪拌後、この混合物を、1Mの塩酸の添加によって、pH 2.5に調節した。固体を濾過し、水 (5×25ml) で洗浄し、そして真空下で乾燥させた。この固体を、2%のメタノール-ジクロロメタン (4×50ml) で洗浄し、真空下で乾燥させて、黄色の粉末として PG-(β-al)-CPT (485mg, 94% 質量収率) を提供した。¹H NMR (TFA-d₄において300MHz): δ 9.45 (s, C-7H), 7.85~8.6 (芳香族プロトン), 5.92 (d, J = 18.3 Hz

z、ラクトンプロトン)、5.70 (s)、5.62 (d, J = 18.3 Hz、ラクトンプロトン)、4.70 ~ 5.10 (m)、3.65 ~ 3.90 (m)、2.00 ~ 3.10 (m)、1.00 (s)。

【0072】

(実施例9)

(PG-(4-NH-ブチリル)-CPT)

0℃に冷却された無水ジメチルホルムアミド(8ml)中の4-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)酪酸(203mg、3.0mmol)の溶液に、20(S)-カンプトセシン(348mg、1.0mmol)、N,N-ジメチルアミノピリジン(244mg、2.0mmol)を添加し、次いで1,3-ジイソプロピルカルボジイミド(379mg、3.0mmol)をゆっくり添加した。この反応混合物を、室温まで暖めた。16時間の攪拌後、この混合物を水(50ml)で処理し、そしてジクロロメタン(4×40ml)で抽出した。合わせた有機抽出物を、0.1Mの塩酸(2×50ml)、水(2×50ml)、0.1Mの重炭酸ナトリウム溶液(2×25ml)、および水(2×50ml)によって洗浄した。硫酸ナトリウム上で乾燥させた後、この溶媒を減圧下で蒸発させた。残渣を、2%のメタノール-ジクロロエタンで溶出するシリカゲルのフラッシュクロマトグラフィーによって精製し、黄色の粉末として20-O-(4-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)ブチリル)-カンプトセシン(432mg、収率81%)を提供した。¹H NMR(CDCl₃): δ 8.35 (s, 1H)、8.22 (d, J = 8.38 Hz, 1H)、7.91 (d, J = 8.07, 1H)、7.76 ~ 7.85 (m, 1H)、7.65 (t, J = 7.4 Hz, 1H)、7.26 (s, 1H)、5.70 (d, J = 17.25 Hz, 1H)、5.40 (d, J = 17.25 Hz, 1H)、5.25 (s, 2H)、4.85 (br s, 1H)、3.05 ~ 3.30 (m, 2H)、2.40 ~ 2.60 (m, 2H)、2.05 ~ 2.30 m (m, 2H)、1.75 ~ 1.90 (m, 2H)、1.40 (s, 9H)、0.95 (t, J = 7.47 Hz, 3H)。トリフルオロ酢酸-ジクロロメタン(1:1, 2ml)中の20-O-(4-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)ブチリル)-カンプトセシン(400mg、0

、75mmol)の溶液を、室温で1時間攪拌した。減圧下での溶媒の蒸発後、この残液を、10%のメタノール-ジクロロエタン(12ml)で粉砕した。濾過によって、黄色の固体として20-O-(4-アミノ、ブチリル)カンプトセシントリフルオロ酢酸塩(331mg、収率83%)を得た。¹H NMR(DMSO-d₆): δ 8.78(s, 1H)、8.05~8.45(m, 2H)、7.65~7.94(m, 2H)、7.05(s, 1H)、5.55(s, 2H)、5.30(s, 2H)、2.60~2.85(m, 4H)、2.00~2.25(m, 2H)、1.70~1.90(m, 2H)、1.00(t, J=7.4 Hz, 3H)。

[0073]

無水ジメチルホルムアミド(13.5ml)中の20-O-(4-アミノ、ブチリル)カンプトセシントリフルオロ酢酸塩(250mg、0.46mmol)、ポリ-(L-グルタミン酸)(414mg)、およびN,N-ジメチルアミノピリジン(168mg、1.38mmol)の懸濁液に、ジメチルホルムアミド(0.5ml)中の1,3-ジイソプロピルカルボジイミド(75mg、0.6mmol)の溶液を、20分にわたって添加した。アルゴン雰囲気下での2日間の攪拌後、この混合物を、氷浴中で冷却し、そして10%の塩化ナトリウム水溶液(35ml)を、30分にわたって添加した。さらなる1時間の攪拌後、この混合物を、1Mの塩酸を添加することによってpH2.5に酸性化し、そして濾過した。この固体を、水(5×25ml)で洗浄し、真空下で乾燥させ、2%のメタノール-ジクロロメタン(4×50ml)で洗浄し、そして真空下で乾燥させて、黄色の粉末としてPG-(4-NH-ブチリル)-CPT(547mg、94%質量収率)を得た。¹H NMR(TFA-dにおいて300MHz): δ 9.45(s, C-7H)、8.30~8.52(m、芳香族プロトン)、8.27(t, J=6.6 Hz、芳香族プロトン)、7.95(s、芳香族プロトン)、7.20(s、芳香族プロトン)、5.92(d, J=18.3 Hz、ラクトンプロトン)、5.70(s)、5.62(d, J=18.3 Hz、ラクトンプロトン)、4.70~5.05(m)、3.45~3.70(m)、2.02~3.00(m)、1.05(br s)。

【 0 0 7 4 】

(実施例 10)

(PG-(2-O-アセチル)-CPT)

20-O-(2-ヒドロキシアセチル)カンプトセシンを、Greenwaldら、Bioorg. Med. Chem. 6:551-562(1998)に記載の手順に従って調製した。

【 0 0 7 5 】

ヨウ化クロロメチルビリジニウム(163mg、0.64mmol)および4-ジメチルアミノビリジン(89mg、0.73mmol)を、連続してジメチルホルムアミド(20ml)中の20-O-(2-ヒドロキシアセチル)カンプトセシン(80mg、0.20mmol)およびポリ-(L-グルタミン酸)(411mg)の溶液に添加した。18時間の攪拌後、この混合物を、氷浴中で冷却し、そして10%の塩化ナトリウム水溶液(50ml)を、1時間の期間にわたって添加した。生じた混合物のpHを、0.1Mの塩酸を添加することによって2に下げた。この沈殿物を、遠心分離後に回収し、そして水(25ml)中に懸濁し、そして遠心分離後に再び回収した。この手順を2回以上繰り返し、そして固体を、真空下で乾燥させた。この固体を、クロロホルム-メタノール(95:5、10ml)中に懸濁し、そして90分間超音波で処理した。この混合物を濾過し、そしてこの固体を真空下で乾燥させて、淡黄色の固体としてPG-(2-O-アセチル)-CPT(404mg、86%質量収支)を提供した。15%の充填量を、回収された20-O-(2-ヒドロキシアセチル)カンプトセシンの質量に基づいて測定した。¹H NMR(300MHz、d₆-DMSO)δ 7.6~8.7(複数のブロードなシグナルCPT Ar-H)、7.15(s、CPT Ar-H)、4.8~5.6(ブロードなシグナル、CPTラクトン、C5-CH₂-)、3.7~4.3(ブロードなシグナル、PG α-CH)、3.1~3.4(ブロードなシグナル、PG)、1.7~2.4(ブロードなシグナル、PG)、1.0(brシグナル、CPT-CH₂-CH₃)。

【 0 0 7 6 】

(実施例 11)

(PG-(4-O-ブチリル)-CPT)

0℃に冷却した無水ジメチルホルムアミド(12 ml)中の20(S)-カンブトセシン(300 mg, 0.86 mmol)および4-ベンジルオキシシブチリル(501 mg, 2.58 mmol)の混合物に、N,N-ジメチルアミノピリジン(210 mg, 1.72 mmol)を添加した。1,3-ジイソプロピルカルボジイミド(326 mg, 2.58 mmol)をゆっくりと添加し、そしてこの反応混合物を室温まで暖めた。15時間の攪拌後、この混合物を、水(50 ml)で処理し、そしてジクロロメタン(4×40 ml)で抽出した。合わせた有機抽出物を、0.1 Mの塩酸(2×50 ml)で洗浄し、水で(2×50 ml)洗浄しそして硫酸ナトリウムで乾燥させた。減圧下での溶媒の蒸発後、この残渣を、2%のメタノール-ジクロロメタンで溶出するシリカゲルのフラッシュクロマトグラフィーによって精製し、黄色の粉末として20-O-(4-ベンジルオキシシブチリル)カンブトセシン(432 mg, 収率81%)を提供した。¹H NMR(CDCl₃): δ 8.35(s, 1H)、8.22(d, J=8.38 Hz, 1H)、7.91(d, J=8.07, 1H)、7.76~7.85(m, 1H)、7.65(t, J=7.4 Hz, 1H)、7.20~7.40(m, 6H)、5.70(d, J=17.25 Hz, 1H)、5.40(d, J=17.25 Hz, 1H)、5.25(s, 2H)、4.52(brs, 2H)、3.45~3.60(m, 2H)、2.60~2.75(m, 2H)、1.90~2.35(m, 4H)、0.95(t, J=7.47 Hz, 3H)。

[0077]

エタノール-1,4-ジオキサン(4:1, 20 ml)中に懸濁された20-O-(4-ベンジルオキシシブチリル)カンブトセシン(1.0 g, 1.90 mmol)および10%の炭素上パラジウム(50%の水, 200 mg)の混合物に、シクロヘキサン(0.78 g, 9.5 mmol)を添加した。緩やかな還流で15分間の加熱後、この混合物を冷却し、そして触媒を濾過によって除去した。減圧下で濃縮後、この固体残渣をメタノール(8.0 ml)で結晶化して、淡黄色の粉末として20-O-(4-ヒドロキシシブチリル)カンブトセシン(679 mg, 収率82%)を提供した。¹H NMR(CD₃OD): 8.40(s,

1 H)、8.05 (d, J = 8.38 Hz, 1 H)、7.91 (d, J = 8.07 Hz, 1 H)、7.76 ~ 7.85 (m, 1 H)、7.65 (t, J = 7.4 Hz, 1 H)、7.30 (s, 1 H)、5.70 (d, J = 17.25 Hz, 1 H)、5.40 (d, J = 17.25 Hz, 1 H)、5.25 (s, 2 H)、3.50 (t, 3 H)、2.50 (t, 2 H)、1.70 ~ 2.30 (m, 4 H)、0.95 (t, J = 7.47 Hz, 3 H)。

【0078】

無水ジメチルホルムアミド (7.5 ml) 中の 2-O-(4-ヒドロキシブチリル) カンプトセシン (114 mg, 0.26 mmol) およびポリ-(L-グルタミン酸) (265 mg, 1.8 mmol) の混合物に、ジメチルアミノピリジン (6 mg, 0.052 mmol) を添加した。1,3-ジイソプロピルカルボジイミド (43 mg, 0.34 mmol) をゆっくりと添加し、そしてこの反応混合物をアルゴン下で5時間攪拌した。氷浴中で冷却した後、10%の塩化ナトリウム水溶液 (18 ml) を滴下して添加した。このpHを、1Nの塩酸を添加することによって2.5に調節した。室温で1時間の攪拌後、この混合物を濾過した。この固体を水 (3×30 ml) で洗浄し、そして真空下で乾燥させた。この粉末を、2%のメタノール-ジクロロメタン (4×30 ml) で洗浄し、そして真空下で乾燥させて、黄色の粉末としてPG-(4-O-ブチリル)-CPT (360 mg, 95% 質量収支) を得た。¹H NMR (TFA-dにおいて300 MHz): δ 9.45 (s, C-7H)、8.30 ~ 8.52 (m, 芳香族プロトン)、8.27 (t, J = 6.6 Hz, 芳香族プロトン)、7.95 (s, 芳香族プロトン)、5.92 (d, J = 18.3 Hz, ラクトンプロトン)、5.70 (s)、5.62 (d, J = 18.3 Hz, ラクトンプロトン)、4.90 (br s)、4.40 (s)、2.00 ~ 2.90 (m)、1.10 (br s)。

【0079】

(実施例12)

(PG-(r-glu)-CPT)

0℃に冷却した無水ジメチルホルムアミド (8 ml) 中のN-(tert-ブ

トキシカルボニル) グルタミル- γ -tert-ブチルエステル (910 mg、3.0 mmol) 溶液に、20 (S)-カンプトセシン (348 mg、1.0 mmol) およびN,N-ジメチルアミノピリジン (244 mg、2.0 mmol) を添加した。1,3-ジイソプロピルカルボジイミド (379 mg、3.0 mmol) をゆっくりと添加し、そしてこの反応混合物を、室温に暖めた。16時間の攪拌後、この混合物を、水 (50 ml) で処理し、そしてジクロロメタン (4×40 ml) で抽出した。合わせた有機抽出物を、0.1 Mの塩酸 (2×50 ml)、水 (2×50 ml)、0.1 Mの塩化ナトリウム水溶液 (5×25 ml)、および水 (2×50 ml) で連続して洗浄した。硫酸ナトリウム上での乾燥の後、この溶媒を減圧下で蒸発させた。残渣を、2%のメタノール-ジクロロメタンで溶出するシリカゲルのフラッシュクロマトグラフィーによって精製し、黄色の粉末として20-O-(N-(tert-ブトキシカルボニル)- γ -グルタミル)カンプトセシン α -tert-ブチルエステル (432 mg、収率81%) を得た。¹H NMR (CDCl₃): δ 8.40 (s, 1H)、8.22 (d, J=8.38 Hz, 1H)、7.91 (d, J=8.07, 1H)、7.65~7.85 (m, 2H)、7.26 (s, 1H)、5.70 (d, J=17.25 Hz, 1H)、5.40 (d, J=17.25 Hz, 1H)、5.25 (s, 2H)、5.05 (br d, 1H)、4.10 (br s, 1H)、1.85~2.70 (m, 6H)、1.45 (m, 18H)、0.95 (t, J=7.47 Hz, 3H)。

[0080]

ジクロロメタン-トリフルオロ酢酸 (1:1, 1 ml) 中の20-O-(N-(tert-ブトキシカルボニル) グルタミル)カンプトセシン α -tert-ブチルエステル溶液 (300 mg、0.47 mmol) を、室温で20分間攪拌した。減圧下での溶媒の蒸発後、この残渣を、メタノール-ジクロロメタン-ヘキサン (1:2:2, 10 ml) で粉碎した。濾過によって、黄色の固体として20-O-(γ -グルタミル)カンプトセシン α -tert-ブチルエステルトリフルオロ酢酸塩 (239 mg、収率79%) を提供した。¹H NMR (DMF-SO-d₆): δ 8.78 (s, 1H)、7.70~8.20 (m, 3H)、7

、0.5 (s, 1H)、5.55 (s, 2H)、5.30 (s, 2H)、(br s, 1H)、1.90~2.85 (m, 6H)、1.50 (s, 9H)、1.00 (t, J=7.4 Hz, 3H)。

【0081】

無水ジメチルホルムアミド(12.5 ml)中の2-O-(γ -グルタミル)カンプトセシン α -tert-ブチルエステルトリフルオロ酢酸塩(239 mg, 0.37 mmol)、ポリ-(L-グルタミン酸)(395 mg, 2.69 mmol)およびN,N-ジメチルアミノピリジン(135.6 mg, 1.11 mmol)の混合物に、ジメチルホルムアミド(0.5 ml)中の1,3-ジイソプロピルカルボジイミド(61 mg, 0.48 mmol)溶液を20分にわたって添加した。アルゴン雰囲気下で2日間の攪拌後、この混合物を氷浴中で冷却し、そして10%の塩化ナトリウム水溶液(30 ml)を30分にわたって添加した。1時間の攪拌後、この混合物を、1Mの塩酸の添加によってpH2.5に酸性化した。固体を濾過し、水(4×30 ml)で洗浄し、そして真空下で乾燥させた。この固体を2%のメタノール-ジクロロメタン(4×50 ml)で洗浄し、そして真空下で乾燥させて、黄色の粉末としてPG-(γ -glu)-CPT α -tert-ブチルエステル(556 mg, 94%質量収率)を提供した。¹H NMR (TFA-dにおいて300 MHz): δ 9.45 (s, C-7H)、7.90~8.60 (m, 芳香族プロトン)、7.25 (s, 芳香族プロトン)、5.92 (d, J=18.3 Hz, ラクトンプロトン)、5.70 (s)、5.62 (d, J=18.3 Hz, ラクトンプロトン)、4.60~5.0 (m)、2.05~3.00 (m)、1.55 (s)、1.10 (br s)。

【0082】

トリフルオロ酢酸(5 ml)中PG-(γ -glu)-CPT α -tert-ブチルエステル(550 mg)の溶液を、16時間室温で攪拌した。減圧下で濃縮した後、残渣を水(100 ml)で洗浄し、そして、減圧下で乾燥し、黄色粉末として、PG-(γ -glu)-CPT(460 mg)を得た。

【0083】

【化16】

¹H NMR (300 MHz in TFA-d): δ 9.45 (s, C-7H), 7.90-8.60 (m, 芳香族プロトン), 5.92 (d, J = 18.3 Hz, ラフトンプロトン), 5.70 (s), 5.62 (d, J = 18.3 Hz, ラフトンプロトン), 4.60-5.0 (m), 2.05-3.00 (m), 1.05 (br s).

(実施例 13)

PG-(10-O-CPT)

ジメチルホルムアミド (30 ml) 中のポリ-(L-グルタミン酸) ナトリウム塩 (50 kD, 740 mg) の懸濁液を、氷浴中で冷却した。メタンスルホン酸 (0.3 ml, 4.6 mmol) を添加し、そして混合物を30分間攪拌した。10-ヒドロキシカンプトセシン (166 mg, 0.45 mmol)、ヨウ化クロロメチルピリジニウム (190 mg, 0.74 mmol) および4-ジメチルアミノピリジン (168 mg, 1.4 mmol) を引き続き添加した。

【0084】

混合物を室温まで温め、そして、20時間、激しく攪拌した。混合物を氷浴中で冷却し、そして、10%塩化ナトリウム水溶液 (100 ml) を、激しく攪拌しながら45分にわたって添加した。0.5 M塩酸の緩徐な添加によって pH 1~2 に酸性化した後、混合物を室温まで温め、そしてさらに30分間攪拌した。固体を遠心分離によって回収し、そして上清をデカントした。この固体を水 (200 ml) 中に懸濁し、そして再び遠心分離に続いて単離した。この洗浄プロセスを2回繰り返し、そして、固体を減圧下で乾燥した。2%メタノール-クロロホルム (25 ml) 中の固体の懸濁液を、90分間超音波処理し、そしてろ過した。この洗浄プロセスを繰り返し、そして固体を減圧下で乾燥し、黄色粉末として PG-(10-O-CPT) (674 mg, 93% の物質収支) を得た。

【0085】

【化17】

¹H NMR (300 MHz, *d*₆-DMSO) δ 7.2 - 8.6

(~~複製の~~アロドシ^{Ar-H}, 5.45, 5.20 (br s, C-17, C-5 CH₂), 0.85
(br^{アロドシ}、C-18 CH₃).

% 充填は、メタノール-クロロホルム洗浄用溶液から回収した 20 (S) - 10 - ヒドロキシカンプトセシンの重量に基づいて、13%であると決定した。

【 0 0 8 6 】

あるいは、PG- (10-O-CPT) を、ポリ- (L-グルタミン酸) ナトリウム塩およびメタンスルホン酸の代わりにポリ- (L-グルタミン酸) を使用して、上に記載される方法に従って合成した。

【 0 0 8 7 】

(実施例 14)

PG-gly- (10-O-CPT)

ジメチルホルムアミド (10 ml) 中の N-tert-ブトキシカルボニルグリシン (603 mg, 3.4 mmol) の溶液を、ジソプロピルカルボジイミド (0.27 ml, 1.7 mmol) を用いて処理した。15 分間攪拌した後、この溶液を、ジメチルホルムアミド (10 ml) 中の 20 (S) - 10 - ヒドロキシカンプトセシン (406 mg, 1.11 mmol) およびピリジン (0.9) の溶液に添加した。4 時間攪拌した後、混合物を水 (300 ml) に注ぎ、そしてクロロホルム (4 × 75 ml) で抽出した。合わせたクロロホルム抽出物を、0.1 M 塩酸 (2 × 100 ml) で洗浄し、続いて飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (2 × 100 ml) で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、そして、減圧下で濃縮した。残渣を、2% メタノール-クロロホルムで溶出するシリカゲル上でのフラッシュクロマトグラフィーによって精製して、淡黄色粉末として 20 (S) - 10 - (N-tert-ブトキシカルボニルグリシルオキシ) カンプトセシン (247 mg, 43%) を得た。

【 0 0 8 8 】

【 化 18 】

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.32 (s, 1 H), 8.21 (d, J = 8 Hz, 1 H), 7.70 (d, J = 3 Hz, 1 H), 7.64 (s, 1 H), 7.56 (dd, J = 8, 3 Hz, 1 H), 5.73 (d, J = 15 Hz, 1 H), 5.28 (d, J = 15 Hz, 1 H), 5.25 (s, 2 H), 5.17 (m, 1 H), 4.26 (d, J = 7 Hz, 2 H), 1.88 (sep., J = 6 Hz, 2 H), 1.49 (s, 9 H), 1.04 (t, J = 6 Hz, 3 H).

ジクロロメタン (10 ml) およびトリフルオロ酢酸 (5 ml) 中の 20 (S) - 10 - (N-tert-ブトキシカルボニルグリシロキシ) カンプトセシン (206 mg, 0.39 mmol) の溶液を、90 分間攪拌した。減圧下で濃縮した後、残渣を、クロロホルム (50 ml) 中に溶解し、そして減圧下で濃縮した。この残渣をトルエン (50 ml) 中に溶解し、そして減圧下で濃縮して、20 (S) - 10 - (グリシロキシ) カンプトセシンを得た。

[0089]

ジメチルホルムアミド (10 ml) 中の 20 (S) - 10 - (グリシロキシ) カンプトセシンの溶液を、ジメチルホルムアミド (20 ml) 中のポリ- (L-グルタミン酸) (50 kD, 641 mg) の溶液に添加し、その後、4-ジメチルアミノピリジン (151 mg, 1.2 mmol) およびジイソプロピルカルボジイミド (0.08 ml, 0.5 mmol) を添加した。60 時間激しく攪拌した後、混合物を氷浴中で冷却し、そして、10% 塩化ナトリウム水溶液 (75 ml) を、激しく攪拌しながら 1 時間にわたって添加した。0.5 M 塩酸の緩徐な添加によって pH 1 ~ 2 に酸性化した後、混合物を室温で温め、そして 30 分間攪拌した。固体を遠心分離によって回収し、そして上清をデカントした。この固体を水 (200 ml) 中に懸濁し、そして再び遠心分離に続いて単離した。この洗浄プロセスを 2 回繰り返し、そして固体を減圧下で乾燥した。2% メタノール-クロロホルム (25 ml) 中の固体の懸濁液を、90 分間超音波処理し、そしてろ過した。2% メタノール-クロロホルムを用いるこの洗浄プロセスを繰り返した。固体を、減圧下で乾燥して、黄色粉末として PG-glucose (10-O-CPT) (560 mg, 70%) を得た。

[0090]

[化 19]

¹H NMR (300

MHz, *d*₆-DMSO) : 7.2 - 8.8 (複数のアロマトリックアル, Ar-H), 5.45, 5.20 (br s, C-17, C-5 CH₂), 0.9 (br s, C-18 CH₃).

(実施例 15)

PG - (9 - NH - CPT)

20 (S) - 9 - アミノカンプトセシン (157 mg, 0.43 mmol) およびポリ - (L - グルタミン酸) (38 kD, 628 mg) の混合物 (4 時間減圧下で乾燥) に、無水ジメチルホルムアミド (35 ml) を添加した。氷浴中で冷却した後、ヨウ化 2 - クロロメチルピリジニウム (199 mg, 0.78 mmol) および N, N - ジメチルアミノピリジン (200 mg, 1.64 mmol) を添加し、そして混合物を室温まで温めた。2 日間攪拌した後、混合物を 0℃まで冷却し、そして 10% 塩化ナトリウム水溶液 (82 ml) を、25 分にわたって添加した。混合物を、1 M 塩酸 (3.5 ml) の添加によって pH 2.5 まで酸性化し、そして 1 時間室温で攪拌した。沈殿物をろ過し、水 (4 × 50 ml) で洗浄し、そして減圧下で乾燥した。固体を、粉末に粉碎し、そして 2% メタノール - ジクロロメタン (10 ml) 中に懸濁した。3 時間懸濁した後、固体を遠心分離によって分離し、そして上清をデカント (decant) した。この洗浄プロセスを 4 回繰り返して、未反応の 20 (S) - 9 - アミノカンプトセシンを完全に除去した。固体を減圧下で乾燥して、PG - (9 - NH - CPT) (592 mg, 回収された 20 (S) - 9 - アミノカンプトセシン (45 mg) の重量に基づいて 80% の物質収支) を得た。

[0091]

[化 20]

¹H NMR (300 MHz in

DMSO-*d*₆) : 12.10 (s, -COOH), 8.80 (s), 6.50-8.5 (m), 5.15-5.8 (m), 3.10-4.35 (m), 1.42-2.62 (m), 0.90 (br s, 19-CH₃).

PG - (9 - NH - CPT) のこのサンプル中の 20 (S) - 9 - アミノカン

プトセシンの%重量充填を、カップリング反応の間に消費された20(S)-9-アミノカンプトセシン(115mg)の重量に基づいて、14%であることを決定した。

[0092]

(実施例16)

PG-gly-(9-NH-CPT)

20(S)-9-(N-tert-プトキシカルボニルグリシルアミノ)カンプトセシンを、Wallら、J. Med. Chem. 1993, 36, 2689-2700によって記載される方法の改変によって調製した。無水ジメチルホルムアミド(10ml)中のN-tert-プトキシカルボニルグリシン(526mg, 3.0mmol)の溶液に、20(S)-9-アミノカンプトセシン(363mg, 1.0mmol)を添加し、続いて30分にわたって1,3-ジイソプロピルカルボジイミド(379mg, 3.0mmol)を添加した。12時間アルゴン雰囲気下で攪拌した後、混合物を水(50ml)で処理し、そしてジクロロメタン(3×100ml)で抽出した。合わせた有機抽出物を、水(50ml)、0.1M塩酸(2×50ml)、0.1M飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、および水(50ml)で洗浄した。溶液を、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして減圧下で濃縮した。残渣を結晶化して(メタノール-クロロホルム(1:9))、黄色粉末として20(S)-9-(N-tert-プトキシカルボニルグリシルアミノ)カンプトセシン(354mg, 68%収量)を得た。

[0093]

[化21]

¹H NMR (DMSO-d₆): δ 10.10 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.03 (d, J = 7 Hz, 1H), 7.85 (t, J = 7 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 7 Hz, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.19 (t, J = 6 Hz, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 3.92 (m, 2H), 1.88 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 0.89 (t, J = 7 Hz, 3H).

トリフルオロ酢酸-ジクロロメタン(1:1, 4ml)中の20(S)-9-(N-tert-プトキシカルボニルグリシルアミノ)カンプトセシン(80m

g、0.15 mmol) の溶液を、室温で1時間攪拌した。溶媒を、減圧下でエバポレートさせ、そして固体を再結晶して(ジクロロメタン-ジエチルエーテル(3:7、50 ml))、茶色がかった黄色粉末として20(S)-9-(グリシルアミノ)カンプトセシントリフルオロ酢酸塩(78 mg、82%収率)を得た。

[0094]

無水ジメチルホルムアミド(5.5 ml)中の20(S)-9-(グリシルアミノ)カンプトセシントリフルオロ酢酸塩(78 mg、0.15 mmol)、ボリー(L-グルタミン酸)(38 kD、222 mg)、およびN、N-ジメチルアミノピリジン(46 mg、0.37 mmol)の攪拌懸濁液に、ジメチルホルムアミド(0.5 ml)中の1,3-ジイソプロピルカルボジイミド(17 mg、0.14 mmol)の溶液を20分にわたって添加した。2日間アルゴン雰囲気下で攪拌した後、混合物を氷浴中で冷却し、そして10%塩化ナトリウム水溶液(15 ml)を30分にわたって添加した。さらに1時間攪拌した後、混合物を、1M塩酸(1.5 ml)の添加によってpH2.5に酸性化し、そしてろ過した。固体を、水(5×25 ml)で洗浄し、減圧下で乾燥し、2%メタノール-ジクロロメタン(3×50 ml)で洗浄し、そして減圧下で乾燥して、茶色がかった黄色粉末としてPG-gly-(9-NH-CPT)(255 mg、92%重量収率)を得た。PG-gly-(9-NH-CPT)のこのサンプル中の20(S)-9-アミノカンプトセシンの%重量充填を、カップリング反応において消費された20(S)-9-アミノカンプトセシンの重量に基づいて20%であると決定した。

[0095]

(実施例17)

PG-gly-(10-OH-CPT)

ジイソプロピルカルボジイミド(0.36 ml、2.3 mmol)を、ジクロロメタン(20 ml)中の20(S)-10-tert-ブトキシカルボニルオキシカンプトセシン(350 mg、0.77 mmol)、N-tert-ブトキシカルボニルグリシン(403 mg、2.3 mmol)および4-ジメチルアミ

ノピリジン (283 mg、2.3 mmol) の溶液に添加した。20 時間攪拌した後、混合物をクロロホルム (150 ml) で希釈し、そして 1 M 塩酸 (2 × 100 ml) で洗浄し、続いて飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 - 水 (1 : 1、2 × 50 ml) で洗浄した。有機相を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、そして減圧下で濃縮した。残渣を、1 % メタノール-クロロホルムで溶出するシリカゲル上でのフラッシュクロマトグラフィーによって精製して、黄色粉末として、20-O-(N-tert-ブトキシカルボニルグリシル)-10-(tert-ブトキシカルボニルオキシ)カンプトセシン (250 mg、52 % 収率) を得た。

[0096]

[化 22]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.34 (s, 1 H), 8.23 (d, J = 8 Hz, 1 H), 7.74 (d, J = 2 Hz, 1 H), 7.67 (dd, J = 8, 2 Hz, 1 H), 5.70 (d, J = 17 Hz, 1 H), 5.41 (d, J = 17 Hz, 1 H), 5.27 (s, 2 H), 4.96 (m, 1 H), 4.29-4.03 (m, 2 H), 2.23 (d, sex., J = 31, 6 Hz, 2 H), 1.63 (s, 9 H), 1.43 (s, 9 H), 1.00 (t, J = 6 Hz, 3 H).

ジクロロメタン (40 ml) およびトリフルオロ酢酸 (10 ml) 中の 20-O-(N-tert-ブトキシカルボニルグリシル)-10-(tert-ブトキシカルボニルオキシ)カンプトセシン (250 mg、0.4 mmol) の溶液を、60 分間攪拌した。減圧下で濃縮した後、残渣をメタノール (10 ml) 中に溶解した。トルエン (50 ml) を添加し、溶液を減圧下で濃縮した。この手順を 2 回繰り返して、20-O-グリシル-10-ヒドロキシーカンプトセシンを得た。以前の工程で合成された 20-O-グリシル-10-ヒドロキシーカンプトセシンを、ジメチルホルムアミド (5 ml) 中に溶解し、そして N、N-ジイソプロピルエチルアミン (0.2 ml、1.1 mmol) で処理した。この溶液を、ジメチルホルムアミド (25 ml) 中のポリ-(L-グルタミン酸) (37.7 kD、640 mg) およびジイソプロピルカルボジイミド (0.1 ml、0.64 mmol) の溶液に添加した。18 時間攪拌した後、混合物を氷浴中で冷却し、そして 10 % 塩化ナトリウム水溶液 (75 ml) を、激しく攪拌しながら添加した。0.5 M 塩酸の緩徐な添加による pH 1 ~ 2 への酸性化の後、混合

物を室温まで温め、そして1時間攪拌した。固体を遠心分離によって回収し、そして上清をデカントした。この固体を水(200ml)中に懸濁し、そして再び遠心分離後に単離した。この洗浄プロセスを2回繰り返し、そして固体を減圧下で乾燥した。2%エタノール-クロロホルム(25ml)中の固体の懸濁液を、90分間超音波で処理し、そしてろ過した。洗浄プロセスを繰り返した。次いで固体を減圧下で乾燥して、黄色粉末としてPG-gly-(10-OH-CPT)(663mg、83%の物質収率)を得た:

[0097]

[化23]

¹H NMR (300 MHz, *d*₆-DMSO) δ 7.1-8.5 (複数の芳香族プロトン, Ar-H), 5.45, 5.20 (br s, C-17, C-5 CH₂), 0.9 (br s, C-18 CH₃).

(実施例18)

PG-gly-(7-Et-10-OH-CPT)

20(S)-7-エチル-10-ヒドロキシカンブトセシン(SN38)(333mg、0.85mmol)を、ジメチルホルムアミド(6ml)およびビリジン(2ml)の混合物中に溶解した。ジメチルホルムアミド(2ml)中のジ-tert-ブチル-ジカーボネート(294mg、1.35mmol)の溶液を添加し、混合物を19時間室温で攪拌した。混合物を減圧下で濃縮し、そして残渣を、クロロホルム-メタノール(99:1)で溶出するシリカゲル上でのフラッシュクロマトグラフィーによって精製して、黄色粉末として20(S)-10-tert-ブトキシカルボニルオキシ-7-エチルカンブトセシン(337mg、80%収率)を得た。

[0098]

[化24]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.24 (d, *J* = 12 Hz, 1 H), 7.88 (d, *J* = 4 Hz, 1 H), 7.63-7.70 (m, 2 H), 5.75 (d, *J* = 16 Hz, 1 H), 5.31 (d, *J* = 16 Hz, 1 H), 5.27 (s, 2 H), 3.28 (q, *J* = 7 Hz, 2 H), 1.90 (sep., *J* = 8 Hz, 2 H), 1.61 (s, 9 H), 1.43 (t, *J* = 7 Hz, 3 H), 1.08 (t, *J* = 8 Hz, 3 H).

1- (3-ジメチルアミノプロピル) - 3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (192 mg, 1.0 mmol) を、ジクロロメタン (15 ml) 中の 10-tert-ブトキシカルボニルオキシ-7-エチルカンプトセシン (150 mg, 0.30 mmol)、N-(tert-ブトキシカルボニル) グリシン (178 mg, 1.0 mmol) および 4-ジメチルアミノピリジン (137 mg, 1.1 mmol) の溶液に添加した。24 時間攪拌した後、混合物をクロロホルム (75 ml) で希釈し、そして 1 M 塩酸 (2 × 50 ml) ならびに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液および水の溶液 (1 : 1, 2 × 50 ml) で洗浄した。有機相を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、そして減圧下で濃縮した。残渣を、クロロホルム-メタノール (99 : 1) で溶出するシリカゲル上でのフラッシュクロマトグラフィーによって精製して、黄色粉末として 20-O-(N-tert-ブトキシカルボニル) グリシル)-10-tert-ブトキシカルボニルオキシ-7-エチルカンプトセシン (41 mg, 20% 収率) を得た。

[0 0 9 9]

[化 2 5]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.27 (d, *J* = 9 Hz, 1 H), 7.90 (d, *J* = 3 Hz, 1 H), 7.68 (dd, *J* = 9, 3 Hz, 1 H), 5.72 (d, *J* = 17 Hz, 1 H), 5.42 (d, *J* = 17 Hz, 1 H), 5.25 (s, 2 H), 4.96 (m, 1 H), 4.29-4.03 (m, 2 H), 3.17 (q, *J* = 7 Hz, 2 H), 2.23 (d. sex., *J* = 31, 6 Hz, 2 H), 1.63 (s, 9 H), 1.48-1.38 (m, 12 H), 1.00 (t, *J* = 6 Hz, 3 H).

20-O-(N-(tert-ブトキシカルボニル) グリシル)-10-tert-ブトキシカルボニルオキシ-7-エチルカンプトセシン (40 mg, 0.06 mmol) を、ジクロロメタン (25 ml) 中に溶解し、トリフルオロ酢酸

(15 ml) を添加した。1 時間攪拌した後、混合物を減圧下で濃縮した。残渣を、メタノール (20 ml) に溶解し、そしてトルエン (20 ml) を添加した。溶液を減圧下で濃縮した。この手順をさらに 2 回繰り返した。得られた固体を、ジメチルホルムアミド (3 ml) 中に溶解し、そして N, N-ジイソプロピルエチルアミン (0.03 ml, 0.17 mmol) で処理した。この溶液を、ジメチルホルムアミド (6 ml) 中のポリ- (L-グルタミン酸) (168 mg) およびジイソプロピルカルボジイミド (0.02 ml, 0.13 mmol) の溶液に添加した。21 時間攪拌した後、混合物を氷浴中で冷却し、そして、10% 塩化ナトリウム水溶液 (30 ml) を、激しく攪拌しながら 60 分にわたって添加した。次いで、0.5 M 塩酸の緩徐な添加によってこの混合物の pH を 1 ~ 2 に低下させた。混合物を室温まで温め、そしてさらに 60 分間攪拌した。混合物を遠心分離し、そして上清をデカントした。この固体を水 (75 ml) 中に懸濁し、そして再び遠心分離によって分離した。この連続工程をさらに 2 回繰り返し、そして、固体を減圧下で 24 時間乾燥した。固体を、クロロホルム-メタノール (9 : 2, 25 ml) 中に懸濁し、そして得られたスラリーを、90 分間超音波処理した。混合物をろ過し、連続工程を繰り返した。固体を、減圧下で乾燥して、黄色粉末として P G - g l y - (7 - E t - 10 - O H - C P T) (112 mg, 54% の物質収支) を得た。¹ H NMR スペクトルの積分は、12% の重量充填を示す。

[0 1 0 0]

[化 2 6]

¹H NMR (300 MHz, d-TFA) δ 8.5 - 7.7

(複数のアロドナール, Ar-H), 6.0-5.6 (br. s, ³J_{HH} C-17, C-5 CH₂), 4.6 (m, gly CH₂), 3.5 (m, 7-Ethyl CH₂), 1.6 (br. t, 7-Ethyl CH₃), 0.9 (br t, C-18 CH₃).

(実施例 19)

P G - g l y - (7 - t - B u M e ₂ S i - 10 - O A c - C P T)

ジクロロメタン (0.5 ml) およびピリジン (0.1 ml, 1.2 mmol) の混合物中の 20 (S) - 7 - (t e r t - ブチルジメチルシリル) - 10 -

ヒドロキシカンプトセシン (DB 67; Bomra, J. Med. Chem. 43 : 3970-80 (2000)) (38 mg, 0.08 mmol) の溶液に、無水酢酸 (0.04 ml, 0.42 mmol) を添加した。20 時間攪拌した後、反応混合物を減圧下で濃縮した。残渣を、クロロホルム-メタノール (99:1) で溶出するシリカゲル上でのフラッシュクロマトグラフィーによって精製して、黄色粉末として 10-アセトキシ-7-(tert-ブチルジメチルシリル)カンプトセシン (29 mg, 70%) を得た。

[0 1 0 1]

[化 2 7]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.23 (d, 1 H, *J* = 10 Hz), 8.08 (d, 1 H, *J* = 2 Hz), 7.67 (s, 1 H), 7.53 (dd, 1 H, *J* = 10, 2 Hz), 5.75 (d, 1 H, *J* = 15 Hz), 5.34 (s, 2 H), 5.30 (d, 1 H, *J* = 15 Hz), 2.39 (s, 3 H), 1.88 (hep, 2 H, *J* = 9 Hz), 1.06 (t, 3 H, *J* = 9 H), 0.98 (s, 9 H), 0.69 (s, 6 H).

1-(3-(ジメチルアミノ)プロピル)-3-エチルカルボジイミドハイドロクロライド (35 mg, 0.18 mmol) を、10-アセトキシ-7-(tert-ブチルジメチルシリル)カンプトセシン (30 mg, 0.058 mmol)、N-(tert-ブトキシカルボニル)グリシン (33 mg, 0.19 mmol)、および 4-ジメチルアミノピリジン (16 mg, 0.13 mmol) のジクロロメタン溶液に添加した。20 時間攪拌した後、この混合物を、ジクロロメタン (25 ml) を用いて希釈し、そして得られた溶液を、1 M 塩酸を用いて洗浄した (2 × 20 ml)。有機相を、硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、減圧下で濃縮した。残渣を、1%メタノール-クロロホルムを用いて溶出するシリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィーによって精製し、10-アセトキシ-20-O-(N-(tert-ブトキシカルボニル)グリシル)-7-(tert-ブチルジメチルシリル)カンプトセシン (24 mg, 61% 収率) を黄色粉末として得た。

[0 1 0 2]

[化 2 8]

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.23 (d, 1 H, $J = 10$ Hz), 8.11 (d, 1 H, $J = 2$ Hz), 7.56 (dd, 1 H, $J = 10, 2$ Hz), 7.22 (s, 1 H), 5.68 (d, 1 H, $J = 15$ Hz), 5.40 (d, 1 H, $J = 15$ Hz), 5.29 (s, 2 H), 4.95 (br s, 1 H), 4.27-4.00 (m, 2 H), 2.40 (s, 3 H), 2.36-2.13 (m, 2 H), 1.43 (s, 9 H), 1.01-0.95 (m, 12 H), 0.70 (s, 6 H).

10-アセトキシ-20-O-(N-(tert-ブトキシカルボニル)グリシル)-7-(tert-ブチルジメチルシリル)カンプトセシン (21 mg, 0.031 mmol) のジクロロメタン溶液 (5 ml) に、トリフルオロ酢酸 (2.5 ml) を添加した。90 分間の攪拌後、この混合物を、減圧下で濃縮した。残渣を、メタノール-トルエン (1:1, 4 ml) に溶解した。この溶液を、減圧下で濃縮した。この手順を、さらに2回繰り返し、10-アセトキシ-7-(tert-ブチルジメチルシリル)-20-O-(グリシル)カンプトセシントリフルオロ酢酸塩 (これを、さらなる精製無しで次の工程に使用した) を得た。

[0 1 0 3]

[化 2 9]

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 8.21-8.11 (m, 2 H), 7.68-7.63 (m, 1 H), 7.42 (s, 1 H), 5.69-5.38 (m, 4 H), 4.22 (q, 2 H, $J = 18$ Hz), 2.39 (s, 3 H), 2.33-2.20 (m, 2 H), 1.07 (t, 3 H, $J = 8$ Hz), 1.00 (s, 9 H), 0.75 (s, 6 H).

4-ジメチルアミノピリジン (12 mg, 0.098 mmol) およびジソプロピルカルボジイミド (0.1 M ジメチルホルムアミド溶液 (0.37 ml)) を、アセトキシ-7-(tert-ブチルジメチルシリル)-20-O-(グリシル)カンプトセシントリフルオロ酢酸塩 (0.03 mmol) およびポリ-(L-グルタミン酸) (64 mg) のジメチルホルムアミド溶液 (5 ml) に連続して添加した。20 時間攪拌した後、この混合物を氷冷浴中で冷却し、そして10%の塩化ナトリウム水溶液 (20 ml) を、30 分間にわたって添加した。この混合物の pH を、0.1 M 塩酸をゆっくりと添加することによって pH 2

に低下させた。沈殿物を、遠心分離によって回収した。固体を、水 (10 ml) に懸濁し、そして再び遠心分離後に単離した。この連続を、さらに 2 回繰り返して、そして固体を減圧下で乾燥させた。次いで、この固体を、5 % メタノール-クロロホルム (10 ml) に懸濁し、90 分間超音波で処理した。この混合物を濾過し、そして回収した固体を、減圧下で乾燥させて、PG-グリー (7 - t - BuMe₃Si-10-OAc-CPT) (69 mg、84 % の物質収支) を淡黄色固体として得た。¹ H の積分は、15 充填 % 重量を示した。

[0 1 0 4]

[化 3 0]

¹H
NMR (300 MHz, CF₃CO₂D) δ 8.71 (br s, CPT Ar-H), 8.17 (s, CPT Ar-H),
7.99-7.91 (m, CPT Ar-H), 6.00-5.58 (m, CPT アロマトン, C6-CH₂),
5.00-4.77 (m, PG α-CH), 3.84 (s, Gly CH₂), 2.78-2.59 (m, PG-CH₂),
2.38-2.05 (m, PG-CH₂), 1.30 (br s, CPT-CH₂CH₃), 1.12 (br s, CPT
(CH₃)₃CSi(CH₃)₂), 0.88 (br s, CPT (CH₃)₃CSi(CH₃)₂).

(実施例 20 : インビボの生物学的活性)

(A . カンプトセシン結合体)

最大寛容用量 (MTD) および PG-CPT 結合体の相対的な効果を、皮下 B16 黒色腫を保有する C57BL/6 マウスにおいて、単回の腹腔内注射を用いて最初に試験した。B16 黒色腫は、20 (S) - カンプトセシンにかろうじて弱く反応性であるが、短期間で化合物を評価するその再現性および能力に起因して、このモデルを使用して、効果の予備的な評価のために種々の化合物をスクリーニングした。0.2 ml 容量の PBS (これは、2 % FBS を補充した) 中の 1.0×10^5 マウス黒色腫細胞 (B-16-FO; ATTC CRL-6322) を皮下注射することによって、腫瘍が右の肩甲骨間領域の筋肉に発生した。試験化合物およびピヒクルコントロールを、腫瘍細胞移植の 7 または 8 日後 (このとき、腫瘍は $5 \pm 1 \text{ mm}^3$ に増殖していた) に、投与した (20 g 体重当たり 0.5 ml) 。カンプトセシン結合体を、45 °C で 45 ~ 60 分間の超音波処理によって 0.1 M Na₂HPO₄ 溶液に溶解した。ネイティブのカンプトセシ

ンを、0.75%生理食塩水中の8.3% Cremophor EL/8.3% エタノールの混合物に溶解した。全ての注射を、腹腔内 (IP) に与えた。各処置群は、各群に無作為に割当てた10匹のマウスからなる。腫瘍容積を、式 (長さ×幅×高さ) / 2 に従って算出した。2000mm³ 以上の腫瘍を有するマウスを、頸部の脱臼によって安楽死 (euthenize) させた。試験化合物の腫瘍の効果を、腫瘍増殖遅延 (TGD) (処置群の腫瘍が固定された容積に達成する平均時間 (日) - コントロール群の腫瘍がその同じ容積に達成する平均時間) を算出することによって決定した。独立チューデントの t-検定を実施して、統計学的な差異を決定した。これらの化合物を、異なる濃度で試験し、その MTD を決定した。MTD は、寛容された当量のカンプトセシンの最大用量である。PG-20 (S) - カンプトセシン結合体の MTD が、遊離の 20 (S) - カンプトセシンの MTD よりも約 2 倍高いことを見出した。従って、増強された抗腫瘍の効果を生じるより高い用量のカンプトセシンの投与が可能になる。直接結合された 20 (S) カンプトセシンである PG-CPT に関して、最大充填は、約 14% (20 (S) - カンプトセシン重量 / 結合体の総重量) であった。グリシンリンカー (PG-gly-CPT) は、39% までの充填を可能にし、水溶性を増強した。

【 0105 】

(B. 動物モデルを用いた、腫瘍増殖に対する種々の PG-カンプトセシン結合体の効果)

一般的に、20 (S) - カンプトセシンの PG-グリシン結合体が、他のリンカーを用いて作製された PG-CPT 結合体よりも優れ (生物学的に、すなわち、効力および毒性ならびに / または水性媒体中の可溶性に関して、ならびに PG 骨格に充填され得るカンプトセシンの合成の容易さおよび量)、そして 20 (S) - 9-アミノカンプトセシン、20 (S) - 10-ヒドロキシカンプトセシン、20 (S) - 7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン (SN 38) および 20 (S) - 10-アセトキシ-7- (tert-ブチルジメチルシリル) カンプトセシン (10-Oアセチル DB 67) からなる PG-gly-結合体に匹敵することが見出された。本願特許請求の範囲を指示するデータを、以下

に要約する。

【 0 1 0 6 】

いくつかの実験において、PG結合体を、結合体化していない20(S)-カンプトセシンまたは市販および臨床的に利用可能なトポテカン (topotecan) と比較した。全ての場合、PG結合体は、遊離の薬物よりも良好な抗腫瘍効果を示した。

【 0 1 0 7 】

さらに、2つの他の腫瘍モデル(MCA-4乳癌およびOCA-1卵巣癌)における単回用量の効果の研究によって、PG-CPT(直接結合されたかまたはグリシンリンカーを用いるかのいずれかである)がまた、ネイティブの20(S)-カンプトセシンと比較してそのMTDに増強された効果を有するということが、ならびにPG結合体のMTDが未処理のCPTのMTDよりも約2倍高かったことが実証された。上記のモデルに加えて、1つの他の同系モデル、すなわちLL/2 Lewis肺(ATTC CRL-1642)を使用し、そして2つの異種モデル、すなわちヒトNCI-H460肺癌腫(ATTC HTB-177)およびHT-29ヒト結腸癌腫(ATTC HTB-38)を使用した。免疫適格性のC57BL/6マウスの代わりにこれらの異種モデルにおいて、免疫無防備な無胸腺n cr nu/nuマウスを使用した。腫瘍を生成するための移植した腫瘍細胞の数以外は、実験プロトコールおよび手順は、B-16/F0モデルに対するもの同一であった。

【 0 1 0 8 】

グリシン以外の全部で6個のリンカーを使用して、20(S)-カンプトセシンのPG結合体を作製した。全ての結合体において、PGは、同じロット由来であり、そして50 kDの平均MWを有した。異なる結合体を、B-16モデルを用いる多数の実験において試験して、PG-gly-CPTに対して比較した。最初に、グリシン結合体が、試験した3つ全ての20(S)-カンプトセシン濃度において、2-ヒドロキシ酢酸(グリコール酸)結合体よりも、より効果的であることが実証された。第2に、グリシン結合体が、グルタミン酸(glu)、アラニン(ala)、 β -アラニン(β -ala)および4-アミノ酪酸を用い

て作製した結合体よりも、B-16モデルにおいて有意により効果的であったことが実証された。

【 0 1 0 9 】

これらの結合体充填は、 β -ala連結20(S)-カンプトセシンに対する22%からgly-連結20(S)カンプトセシンに対する37%に変化した。評価しかつglyと比較した別のリンカーは、4-ヒドロキシ酪酸であった。2つの結合体は、同じ量の20(S)-カンプトセシン充填(35%)を有し、そしてB-16/FOModel、LL/2モデルおよびHT-29モデルを用いた多数のアッセイにおいて比較した。グリシン結合体が4-ヒドロキシ酪酸結合体に等しいかまたはこれよりも効果的であることが、実証された。さらに、4-ヒドロキシ酪酸結合体は、合成がより困難であり、グリシン結合体よりも水溶性が低く、そして所望されない効果を有し得る。

【 0 1 1 0 】

多数の実験におけるリンカーの長さの効果を、HT-29モデルおよびHCI-H460モデルを用いて研究した。リンカーとしてのgly(例えば、PG-gly-CPT)、gly-gly(二量体)(例えば、PG-gly-gly-CPT)、またはgly-gly-gly(三量体)(例えば、PG-gly-gly-gly-CPT)からなる結合体の効果を、等価な20(S)-カンプトセシンの充填と、比較した。この理論は、より長いリンカーがより安定な形態のPG-CPT結合体を生じ得る(理論的に)ということである。三量体含有結合体が、同じ20(S)-カンプトセシン充填(%)および等価な20(S)-カンプトセシン濃度において、単量体含有結合体および二量体含有結合体(これらは同一の効果を示す)よりも、より効果的のようであった。しかし、三量体含有結合体は、同じ20(S)-カンプトセシン当量の濃度において、モノ-gly結合体よりも、より毒性である。さらに、二量体含有結合体および三量体含有結合体の合成は、グリシン結合体よりも、時間をより浪費し、三量体含有結合体の水溶性は、モノ-gly結合体の水溶性よりも有意に低い。これらの結合体の効果および毒性を決定し得る重要なパラメーターは、とりわけ、PGの平均分子量および20(S)-カンプトセシン充填(%)である。B-16モデルおよ

びHT-29モデルを使用して、50 kDのPGを用いて作製されたPG-gly-CPT結合体が、74 kDまたは33 kDのいずれかのPGを用いて作製されたPG-gly-CPTよりも、より効果的であったことが実証された。従って、50 kD PG-gly-結合体のみに焦点を当てること、および変動する20 (S) カンプトセシン充填の抗腫瘍効果に対する効果を試験することが決定された。HT-29 結腸癌腫を用いた最初の実験において、35%の充填は、25%、20%、または15%が充填された結合体よりも、マウスが、同じ量の20 (S) カンプトセシン等価物を受けた間に明らかにより効果的であることが見出された。充填を35から37%および39%に増加させることは、HT-29モデルおよびまたNCI-H460モデルにおいてその効果をさらに増加させた。47%への充填の増加は、良好な効果をもたらさなかった；事実、この効果は、35%が充填された材料の効果よりも低かった。結合体の水溶性は、35%と39%との間でいくぶん減少し、より高く充填された材料は、最も溶解しにくかった。

【0111】

HT-29モデルを用いた1つの実験において、50 kDのPG-gly-CPTの単一腹腔内(ip)投与の効果が、累積的なカンプトセシン総用量(これは、単一投与で提供される用量の3倍である)をマウスに1週間間隔で4回投与することによってさらに増強され得たことが実証された。この投与レジメンは、マウスによってかなり十分寛容された。理想のPG-gly-CPT結合体は、50 kDの平均MW(粘性により測定)、リンカーとして(モノ)グリシンおよび35~37%の20 (S)-カンプトセシンを有するPGからなる。雄のncr nu/nuマウスにおけるMTDは、40 mg/kg 20 (S)-カンプトセシン当量であり、遊離の20 (S)-カンプトセシンに対するMTDよりも約2倍高い。

【0112】

(C. 他のヒト腫瘍モデル)

雌のヌードマウスに皮下注射で接種したNCI-H3222(ATTC CRL-5806)ヒト肺癌に対するPG-gly-CPT(33 kD、37%が充填

された)の抗腫瘍活性を研究した。薬物を、腫瘍が7~8mmの直径と測定された9、13、17、および21日目に40mg/kgの20(S)-カンプトセシン当量の用量で静脈内注射した。TGDは40日であった。7~8mmの皮下NCI-H460ヒト非小細胞肺癌異種移植片を有する雌のヌードマウスを、1、5、9、および13日目に、1回の注射当たり40mg/kg用量の20(S)-カンプトセシンで、PG-gly-CPTを用いて処理した。4日毎に40mg等量の20(S)-カンプトセシン/kgを4回という試験用量は、MTDをわずかに超えた。死亡しなかったが、体重の減少は、開始体重の約20%であった。完全な腫瘍増殖の遅延(腫瘍が8mm~12mmに増殖する日にちの、処置群とコントロール群との間の差異として規定される)は、PG-gly-CPT処理マウスに関して43日であった。第2の実験において、直接結合されたPG-CPRを、同じスケジュールで腹腔内で試験し、そしてまた観察可能な毒性を伴わずに実質的な増殖の遅延が生じた。

[0 1 1 3]

PG-gly-CPTをまた、NCI-H1299(ATTC CRL-5803)ヒト肺癌細胞の 1.5×10^6 細胞/マウスを用いて皮下注射によって接種した雌のヌードマウスにおいて試験した。このヌードマウスにおける実験前の40mg等量の20(S)-カンプトセシン/kgでの過剰な体重の減少に起因して、用量を、4日毎に30mg等量の20(S)-カンプトセシン/kgを4回に低下させた。この用量は、十分に寛容され、そして32日のTGDが観察された。

[0 1 1 4]

(D. 10-ヒドロキシカンプトセシン結合体)

20(S)-10-ヒドロキシカンプトセシンのPG結合体を用いて、B16モデルにおいて予備的な研究を行った。これらの研究において最も活性な結合体は、直接結合体化されたかまたは20-ヒドロキシル基を介してグリシン連結された材料である。最初の実験において、直接結合した材料PG-(10-OAc-CPT)は、PG-gly-(10-O-CPT)よりも、50mg等量の20(S)-10-ヒドロキシカンプトセシン/kgにおいてより活性なようであ

った。しかし、この用量は、両化合物に対するMTDよりも下であり、PG-(10-OAc-CPT)溶液は、非常に粘性であり、そしてこの化合物は、約30分後に溶液から沈殿し、従って、このことは、この化合物の取り扱いを実用的ではないものになっている。

【0115】

50mg等量の20(S)-10-ヒドロキシカンブトセシン/kgにおいて、PG-(10-OAc-CPT)は、5.3日のTGDを生じた(コントロールと比較して $p < 0.01$)。PG-(10-OH-CPT)に対するMTDが、10mg等量と50mg等量との間の20(S)-10-ヒドロキシカンブトセシン/kgであることは、興味あることである。しかし、50mg/kgの毒性用量においてさえ、これは、PG-(10-OAc-CPT)またはPG-gly-(10-OH-CPT)ほど効果的ではなかった。

【0116】

B-16/FOモデルを用いた直接的な比較において、50kd PG-gly-(10-OH-CPT)結合体がPG-gly-(7-Et-10-OH-CPT)の約2倍効果的であった(同じ充填の割合およびSN38濃度において)ことに注目することは、興味深い。同じ観察が、本発明者らがHT-29モデルを用いてPG-gly-CPTをPG-gly-(7-t-BuMe₂Si-10-OAc-CPT)と比較した場合になされた。一般的に、PG-20(S)-10-ヒドロキシカンブトセカン結合体および10-ヒドロキシカンブトセシン誘導体または(7-t-BuMe₂Si-10-OAc-CPT)のPG結合体が、効果的ではなく、十分に寛容されたか、またはPG-gly-20(S)カンブトセシン結合体のように水溶液に容易に溶解した(これらが、直接連結されたかもしくはグリシン連結されたか、または異なる部位で連結されたか否かにかかわらずに)ことが、見出された。

【0117】

(E. 9-アミノカンブトセシン結合体)

研究によって、PG-9-NH-CPTが活性であり、過剰の25mg等量の20(S)-9-アミノカンブトセシン/kgにおいてMTDを有することが示

された。しかし、20(S)-9-アミノカンプトセシン結合体が、効果的ではなく、十分に寛容されたか、またはPG-gly-20(S)カンプトセシン結合体のように水溶液に容易に溶解した（これらが、直接連結されたかもしくはグリシン連結されたか、またはエステル結合もしくはアミド結合を介して連結されたか、または異なる部位で連結されたか否かにかかわらずに）ことが、見出された。

【0118】

(F. 要約および比較データ)

PG-gly-20(S)-CPT結合体との直接的な比較において、20(S)-9-アミノカンプトセシンを用いて作製したPG結合体も、20(S)-10-ヒドロキシカンプトセシンを用いて作製した結合体も、効果的ではなく、十分に寛容され、PG-gly-CPT結合体のように水溶液に容易に溶解した（これらが、直接連結されたかしくはグリシン連結されたか、またはエステル結合もしくはアミド結合（20(S)-9-アミノカンプトセシンの場合）を通して連結されたか、または異なる部位で連結されたか否かにかかわらずに）。

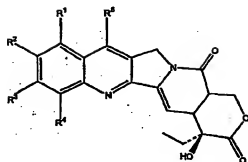
【0119】

本発明は、本発明の特定の実施形態を参照して記載してきたが、本発明の真の精神および範囲から逸脱することなく、種々の変更がなされ得、そして等価物が置換され得ることは、当業者によって理解されるべきである。さらに、多くの改変が、特定の状況、材料、組成物、プロセス、プロセスの工程を適合するために、本発明の目標となる精神および範囲に対してなされ得る。全てのこのような改変は、本明細書に添付される特許請求の範囲内であることが意図される。本明細書中に引用される全ての特許、特許出願および刊行物は、その全体が参考として援用される。

【0120】

【表2】

表 2



ここで、 $R^4 = H$

化合物	R^4	R^1	R^2	R^3
20(S)-カンプトセシン	H	H	H	H
トポテカン	H	$CH_2N(CH_3)_2$	OH	H
20(S)-9-アミノカンプトセシン	H	NH_2	H	H
20(S)-9-ニトロカンプトセシン	H	NO_2	H	H
10-ヒドロキシカンプトセシン	H	H	OH	H
SN-38	CH_2CH_3	H	OH	H
20(S)-10,11-メレンジオキシカンプトセシン	H	H	$-CH_2-O-CH_2-$	
ルロテカン(Larotecton) (GI 147211)	$-CH_2-(N-メチルピペラジン)-$	H	$-O-CH_2-CH_2-O-$	
イリノテカン (CPT-11)	CH_3CH_3	H	$OCO-[1,4'-ジピペリジンニル]$	H
DX-8951F	$-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-$		CH_3	F
DB 67	$-SiMe_2t-Bu$	H	$-OH$	H

[0 1 2 1]

[表 3]

表 3

PG 結合体	結合体中の CPT % (w/w)	水溶性	300MHz ¹ H-NMR スペクトルに おける診断シグナル (DMSO-d6)	マウス単一用量 MTD (IP) (mg/体重 CPT/kg)
PG-CPT (20-結合体化)	14	11 mg/ml	δ 12.1 (幅広い一重線, PG- COOH), 7.4-8.5 (複数の幅広い シグナル, Ar-H), 5.6 (幅広い 一重線, フラクトン-CH ₂), 0.9 (幅広いシグナル, CPT CH ₃ CH ₃)	80-80 mg 当量 CPT/kg
PG-ph-CPT (20-結合体化)	37	25 mg/ml	δ 12.1 (幅広い一重線, PG- COOH), 7.4-8.5 (複数の幅広い シグナル, Ar-H), 5.6 (幅広い 一重線, フラクトン-CH ₂), 0.9 (幅広いシグナル, CPT CH ₃ CH ₃)	80-80 mg 当量 CPT/kg
PG-(10-OA)- CPT (20-結合体化)	13	10 mg/ml	δ 12.1 (幅広い一重線, PG- COOH), 7.2-8.5 (複数の幅広い シグナル, Ar-H), 5.4 (一重線, フラクトン-CH ₂), 5.2 (一重線, CS- H), 0.9 (幅広いシグナル, CPT CH ₃ CH ₃)	10-20 mg 当量 CPT/kg
PG-(10-O-CPT) (10-結合体化)	13	10 mg/ml	δ 12.1 (幅広い一重線, PG- COOH), 7.2-8.5 (複数の幅広い シグナル, Ar-H), 5.4 (一重線, フラクトン-CH ₂), 5.2 (一重線, CS- H), 0.9 (幅広いシグナル, CPT CH ₃ CH ₃)	50 mg 当量 CPT/kg
PG-ph-(10-O- CPT) (10-連結)	20	>10 mg/ml	δ 12.1 (幅広い一重線, PG- COOH), 7.2-8.5 (複数の幅広い シグナル, Ar-H), 5.6 (一重線, フラクトン-CH ₂), 5.2 (一重線, CS- H), 0.9 (幅広いシグナル, CPT CH ₃ CH ₃)	>10<50 mg 当量 CPT/kg
PG-(10-OH- CPT) (20-連結)	19	>10 mg/ml	δ 12.1 (幅広い一重線, PG- COOH), 7.0-8.5 (複数の幅広い シグナル, Ar-H), 5.6 (一重線, フラクトン-CH ₂), 5.2 (一重線, CS- H), 0.9 (幅広いシグナル, CPT CH ₃ CH ₃)	>50 mg 当量 CPT/kg
PG-(9-NH-CPT) (9-結合体化)	14	7 mg/ml	δ 12.1 (幅広い一重線, PG- COOH), 8.0 (幅広い一重線, C7- H), 7.2-8.0 (複数の幅広い シグナル, Ar-H), 5.4 (幅広い 一重線, フラクトン-CH ₂), 0.9 (幅広いシグナル, CPT CH ₃ CH ₃)	>25 mg 当量 CPT/kg
			シグナル, Ar-H), 5.4 (幅広い 一重線, フラクトン-CH ₂), 0.9 (幅広いシグナル, CPT CH ₃ CH ₃)	

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、表 1 において列挙される PG-カンブトセシン (PG-CPT) 結合体の構造を示す。

[图 1]

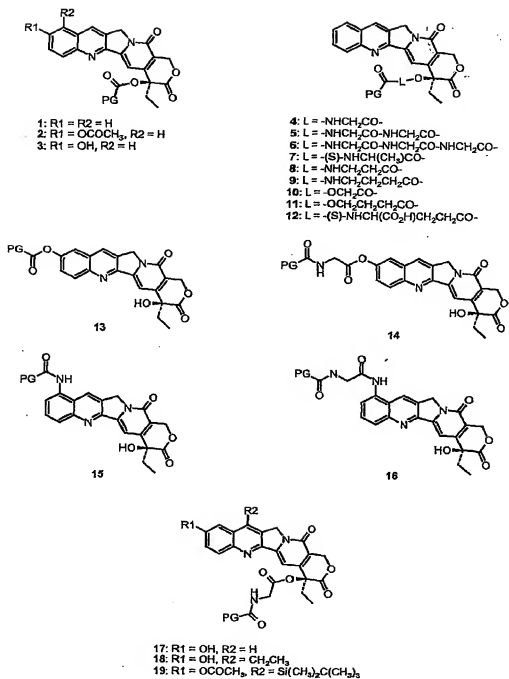


FIGURE 1

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K47/48		International Application No. PCT/US 01/08553
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to be extent the such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	DUNCAN R ET AL: "Polymer-drug conjugates, POEPT and PELT: basic principles for design and transfer from the laboratory to clinic," JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, (2001 JUL 6) 74 (1-3) 135-46., XP001023643 abstract; figure 1	1-23
X	SINGER J W ET AL: "Conjugation of camptothecins to poly-(L-glutamic acid)," ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, (2000) 922 136-50., XP001023451 see discussion page 138; figure 1	1-34
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special manner (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 September 2001		Date of mailing of the international search report 20/09/2001
Address and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5016 Patenlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-0040, Tx. 31 851 apo nl, Fax (+31-70) 340-3010		Authorized officer Gonzalez Ramon, N

Form PCT/ISA/210 (Demand form) (July 2002)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Infr. and Application No.
 PCT/US 01/08553

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LI C. ET AL: "Complete regression of well-established tumors using a novel water soluble poly(l-glutamic acid)-paclitaxel conjugate" CANCER RESEARCH, vol. 58, 1 June 1998 (1998-06-01), pages 2404-2409, XP001015957 page 2404, column 2, paragraph 2	1-34
Y	CONOVER C. D. ET AL: "Camptothecin delivery systems: enhanced efficacy and tumor accumulation of camptothecin following its conjugation to polyethylene glycol via a glycine linker" CANCER CHEMOTHER PHARMACOL, vol. 42, 1998, pages 407-414, XP001023467 abstract	1-34
Y	CONOVER C. D.: "Camptothecin delivery systems: the utility of amino acid spacers for the conjugation of camptothecin with polyethylene glycol to create prodrugs" ANTI-CANCER DRUG DESIGN, vol. 14, December 1999 (1999-12), pages 499-506, XP001023559 abstract	1-34
X	WO 97 33552 A (LI CHUN ; WALLACE SIDNEY (US); YU DONG FANG (US); WALLACE TECH INC) 18 September 1997 (1997-09-18) abstract; claims 1,19; example 2	1-34
X	WO 99 49901 A (LI CHUN ; WALLACE SIDNEY (US); YANG DAVID (US); YU DONG FANG (US);) 7 October 1999 (1999-10-07) claims 1,13; examples 8,9	1-34
Y	US 4 356 166 A (GREGORIS DONALD E ET AL) 26 October 1982 (1982-10-26) abstract; claims 4,8,10	1-34
E	US 6 262 107 B1 (LI CHUN ET AL) 17 July 2001 (2001-07-17) claims 1,5,7	1-34

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1982)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter-
national Application No
PCT/US 01/08553

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9733552	A	18-09-1997	AU 735900 B2	19-07-2001
			AU 2580697 A	01-10-1997
			BR 9710646 A	11-01-2000
			CA 2250295 A1	18-09-1997
			CN 1217662 A	26-05-1999
			CZ 9802908 A3	14-07-1999
			EP 0932399 A1	04-08-1999
			HU 9903952 A2	28-05-2001
			JP 2000507930 T	27-06-2000
			NO 984210 A	11-11-1998
			PL 328807 A1	15-02-1999
			WO 9733552 A1	18-09-1997
			US 6262107 B1	17-07-2001
			US 5977163 A	02-11-1999
WO 9949901	A	07-10-1999	AU 3455699 A	18-10-1999
			EP 1028756 A1	23-08-2000
			WO 9949901 A1	07-10-1999
US 4356166	A	26-10-1982	NONE	
US 6262107	B1	17-07-2001	US 5977163 A	02-11-1999
			AU 735900 B2	19-07-2001
			AU 2580697 A	01-10-1997
			BR 9710646 A	11-01-2000
			CA 2250295 A1	18-09-1997
			CN 1217662 A	26-05-1999
			CZ 9802908 A3	14-07-1999
			EP 0932399 A1	04-08-1999
			HU 9903952 A2	28-05-2001
			JP 2000507930 T	27-06-2000
			NO 984210 A	11-11-1998
			PL 328807 A1	15-02-1999
			WO 9733552 A1	18-09-1997

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CO, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

- (72)発明者 デ ヴライス, ピーター
 アメリカ合衆国 ワシントン 98177,
 シアトル, エヌ ダブリュー, 199
 イーエイチ ストリート 1222
- (72)発明者 クライン, ジェイ, ピーター
 アメリカ合衆国 ワシントン 98070,
 パション, リッジ ロード エスダブリ
 ユー 18822
- (72)発明者 ルイス, ロバート エイ.
 アメリカ合衆国 ワシントン 98102,
 シアトル, イー, ハムリン ストリー
 ト 1215
- (72)発明者 シンガー, ジャック ダブリュー.
 アメリカ合衆国 ワシントン 98122,
 シアトル, イー, スプリング ストリ
 ート 3515
- (72)発明者 チュリンスキー, ジョン
 アメリカ合衆国 ワシントン 98119,
 シアトル, ダブリュー, 4 ティーエ
 イチ アベニュー 626, アバートメン
 ト 103

Fターム(参考) 4C076 AA11 BB01 BB13 BB15 BB16
 BB21 BB24 BB25 BB29 BB30
 BB31 CC27 CC42 EE59E
 FF15 FF68
 4J001 DA01 DB01 DC11 DD03 DD20
 EA36 FA03 FB01 FC01 GE02
 JA20